

Entwicklung und Charakterisierung von Flavoprotein-basierten optogenetischen  
Modulen in *Saccharomyces cerevisiae*

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

dem

Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg

Hochschulkennziffer 1180

vorgelegt von

Sebastian Hepp

(M.Sc. Chemie)

aus

Gießen

Marburg an der Lahn, 2020

Die vorliegende Dissertation wurde unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen von September 2016 bis Juli 2020 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Fachbereich Chemie)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer (Fachbereich Biologie)

Termin der Annahme: 21.08.2020

Disputationstermin: 14.10.2020

*Meinen Eltern, meinen Großeltern und meiner Svenja*

*„Liberæ sunt nostræ cogitationes“*

Marcus Tullius Cicero

## Erklärung

Ich erkläre, dass eine Promotion an noch keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation

„Entwicklung und Charakterisierung von Flavoprotein-basierten optogenetischen Modulen in *Saccharomyces cerevisiae*“

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet, sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Ort/Datum

Unterschrift

(Sebastian Hepp)

## Liste der Veröffentlichungen von Sebastian Hepp

### Veröffentlicht:

Hasenjäger S, Trauth J, **Hepp S**, Goenrich J, Essen LO, Taxis C; Optogenetic Downregulation of Protein Levels with an Ultrasensitive Switch, *ACS Synth. Biol.* 2019, 8, 1026-1036.

**Hepp S**, Trauth J, Hasenjäger S, Bezold F, Essen LO, Taxis C; Rational engineering of an optogenetic tool for induced protein stabilization based on the *Phaeodactylum tricornutum* aureochrome 1a LOV domain, *Journal of Molecular Biology* 2020, 434, 1880-1900.

### Hinterlegte Proteinstrukturen in der PDB:

AuLOV<sup>M254</sup>, PDB: 6t73

AuLOV<sup>W349</sup>, PDB: 6t74

## Zusammenfassung

Im letzten Jahrzehnt, wurde in der Wissenschaft dem Bereich der Optogenetik immer mehr Beachtung geschenkt. So wurden zahlreiche Anwendungen entwickelt, von lichtgesteuerten Ionenkanälen, über Module zur Kontrolle des Proteinlevels, bis zu Modulen um physiologische Prozesse mit Licht zu steuern. All diese Module basieren auf Proteinen, die als Photorezeptoren bezeichnet werden und als Sensordomäne sensitiv für Licht bestimmter Wellenlängen sind. Eine weitverbreitete Familie dieser Proteine sind die LOV-Domänen, welche zu den Blaulichtrezeptoren zählen und aufgrund ihrer geringen Größe (unter 20 kDa) von besonderem Interesse für optogenetische Anwendungen sind. Eine weitere Proteinfamilie, die immer mehr in das Interesse für die Optogenetik rückt, sind die Cryptochrome, welche ebenfalls zu den Blaulichtphotorezeptoren gezählt werden.

In dieser Arbeit ist die Entwicklung von optogenetischen Modulen basierend auf der LOV-Domäne des Aureochroms 1a aus *Phaeodactylum tricornutum* (AuLOV) beschrieben. Dafür wurden verschiedene Mutanten der AuLOV-Domäne strukturell und proteinchemisch charakterisiert. Bei dieser Charakterisierung konnte eine neue Dimerinteraktionsfläche für die AuLOV-Domäne durch Kristallstrukturanalyse gefunden werden. Diese neue Dimeranordnung wurde anschließend bioinformatisch charakterisiert. Für die Entwicklung von einer optogenetischen Applikation wurden verschiedene AuLOV Mutanten im psd-Modul getestet und eine Domäne entwickelt, die das Protein in Dunkelheit destabilisiert (AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup>). Diese Domäne wurde mit der photoaktivierbaren Adenylatcyclase bPAC fusioniert und AuPAC wurde als zweites Modul geschaffen. AuPAC ist eine synergistische, photoaktivierbare Adenylatcyclase, die gezielt über den Proteinkinase A Signalweg zelluläre Funktionen in *S. cerevisiae* steuert. Im Folgenden wurde ein lösliches *in vivo* Konstrukt mCherry-P2A-AuLOV-cODC1 gereinigt und proteinchemisch charakterisiert.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem „animal-like Cryptochrome“ aus *C. reinhardtii* (CraCry), welches aufgrund der verschiedenen Redoxzustände des Chromophors möglicherweise zusätzlich als Rotlichtphotorezeptor fungieren kann. Varianten von CraCry wurden im psd-Modul auf das Verhalten unter verschiedenen Lichtbedingungen in *S. cerevisiae* untersucht und bieten somit ein Potenzial für eine Vielzahl weiterer optogenetischen Applikationen.

## Abstract

In the last decade, the field of optogenetics gained more and more attention in science. Several tools were developed, starting with light controlled ion-channels and devices to control the protein level, up to the control of physiological processes in living cells. These tools are based on photoreceptors, which are light-sensitive proteins for distinct wavelengths. A protein family frequently used in optogenetics are LOV domains. LOV domains are blue-light photoreceptors and have a small size of under 20 kDa. Cryptochromes are another class of blue-light photoreceptors, which are recently getting more attention in the field of optogenetics.

In this thesis an optogenetics tool was developed based on the aureochrome 1a LOV domain from *Phaeodactylum tricornutum* (AuLOV). Therefore, different mutants of the AuLOV domain were characterized *in vitro*, a new dimer interface of the AuLOV domain was identified by crystallization experiments and was characterized by bioinformatics. In order to create an optogenetic tool, AuLOV was tested in the photosensitive degron module (psd) and a darkness destabilization tag (AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup>) was developed. This tag was fused to the photoactive adenylate cyclase bPAC to create AuPAC. AuPAC is a synergistic, photoactive adenylate cyclase, which is able to control cellular functions in *S. cerevisiae*. Furthermore, the soluble *in vivo* construct mCherry-P2A-AuLOV-cODC1 was expressed and characterized.

Another photoreceptor, the „animal-like Cryptochrome“ from *C. reinhardtii* (CraCry), was characterized in the psd-module under different light conditions in *S. cerevisiae*. Based on the different redox forms of the chromophore, CraCry is additionally hypothesized to set as red-light sensitive photoreceptor. CraCry has the potential for different optogenetic applications.



## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Optogenetik - Ein Überblick .....	1
1.2 Proteinabbau und dessen Anwendung in der synthetischen Biologie.....	3
1.2.1 Ubiquitin-abhängiger Proteinabbau .....	3
1.2.2 Ubiquitin-unabhängiger Proteinabbau .....	5
1.2.3 Synthetische Proteindegradationssysteme.....	6
1.2.4 Das photosensitive Degronmodul .....	8
1.3 LOV-Domänen.....	11
1.3.1 LOV-Domänen im Allgemeinen.....	11
1.3.2 Die AuLOV-Domäne von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	13
1.4 Adenylatcyclasen .....	15
1.4.1 Die photoaktivierbare Adenylatcyclasen (PACs) .....	16
1.5 Cryptochrome.....	17
1.5.1 Das <i>animal-like</i> Cryptochrom aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CraCry) .....	18
1.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus .....	19
2 Zielsetzungen der Arbeit .....	21
3 Material .....	22
3.1 Geräte .....	22
3.2 Chemikalien .....	24
3.3 Verbrauchsmaterial .....	26
3.4 Vorgefertigte Sets.....	27
3.5 Enzyme.....	27

## Inhaltsverzeichnis

3.6 Puffer und Lösungen .....	27
3.7 Medien und Selektionsplatten .....	29
3.8 Antikörper .....	31
3.9 Plasmide .....	31
3.9.1 pET28a(+) Vektor basierte Expressionsplasmide .....	31
3.9.2 Plasmide für <i>in vivo</i> Studien in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
3.10 Primer .....	34
3.11 Stämme.....	36
3.11.1 Bakterielle Stämme .....	36
3.11.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme.....	36
4 Methoden.....	38
4.1. Molekularbiologische Methoden.....	38
4.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	38
4.1.2 DNA-Fällung.....	40
4.1.3 Herstellung von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	40
4.1.4 Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	40
4.1.5 Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	40
4.1.6 Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	41
4.1.7 Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> Zellen .....	41
4.1.8 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	41
4.1.9 Restriktionsverdau.....	42
4.1.10 <i>In vitro</i> Ligation .....	42
4.1.11 Gelelektrophorese.....	43
4.1.12 DNA-Sequenzierung .....	43
4.1.13 Präparation von kompetenten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zellen .....	43

## Inhaltsverzeichnis

4.1.14 Transformation von chemisch-kompetenten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zellen.....	43
4.1.15 <i>In vivo</i> Ligation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
4.1.16 Isolation von DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
4.1.17 Integration von DNA-Sequenzen in das Genom von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
4.1.18 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	45
4.1.19 Fluoreszenzmessungen von fluoreszenzmarkierten Proteinen in <i>S. cerevisiae</i> .....	45
4.1.20 Westernblot Analyse .....	46
4.1.21 Wachstumstest SC-Agar Platten .....	47
4.1.22 Wachstumstest in Flüssigmedium .....	47
4.1.23 Verfolgung der Msn2-mCherry Lokalisation in <i>S. cerevisiae</i> per Mikroskop.....	48
4.1.24 Bestimmung des cAMP-Levels in <i>S. cerevisiae</i> .....	48
4.2. Proteinbiochemische Methoden .....	49
4.2.1 Proteinüberproduktion.....	49
4.2.2 Proteinisolation und Proteinreinigung.....	49
4.2.3 SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinheit von Proteinen .....	50
4.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Bradfordmethode .....	51
4.2.5 Analytische SEC-Chromatographie .....	51
4.2.6 UV/VIS Spektroskopie.....	52
4.2.7 Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS).....	53
4.2.8 Proteinkristallisation und Strukturlösung.....	53
4.2.9 Bioinformatische Analyse von Dimerinteraktionsflächen .....	53
4.2.10 Erstellung eines Homologiemodells mit Chimera .....	54
5 Ergebnisse .....	55
5.1 Proteinchemische und strukturelle Charakterisierung von AuLOV-Mutanten .....	55
5.1.1 Reinigung der AuLOV-Mutanten .....	55

## Inhaltsverzeichnis

5.1.2 Bestimmung des oligomeren Zustandes der AuLOV-Mutanten mittels analytischer SEC .....	56
5.1.3 UV/VIS spektroskopische Charakterisierung der AuLOV-Mutanten .....	60
5.1.4 Strukturelle Charakterisierung der AuLOV Dimerisierungsfläche.....	63
5.2 Reinigung und proteinchemische Charakterisierung eines <i>in vivo</i> Konstruktes .....	70
5.2.1. Reinigung des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes .....	71
5.2.2 Charakterisierung des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes .....	72
5.3 Entwicklung einer optogenetischen Anwendung basierend auf der AuLOV-Domäne in <i>S. cerevisiae</i> .....	75
5.3.1 Verbesserung des Schaltverhaltens der AuLOV-Domäne im psd-Modul .....	75
5.3.2 Entwicklung einer AuLOV basierten Anwendung in <i>S. cerevisiae</i> . ....	79
5.3.3 AuPAC als blaulichabhängige Adenylatcyclase in <i>S. cerevisiae</i> .....	80
5.3.4 Kontrolle der Msn2-Lokalisation durch AuPAC in <i>S. cerevisiae</i> .....	83
5.4 Das <i>animal-like</i> Cryptochroms (CraCry) aus <i>C. reinhardtii</i> im photosensitiven Degronmodul .....	85
5.4.1 Erste Messungen des <i>animal-like</i> Cryptochroms im photosensitiven Degronmodul .....	86
5.4.3 Kinetische Untersuchungen der CraCry Variante drei (CraCryV3) .....	89
6 Diskussion .....	91
6.1 Physiologische Bedeutung der neuen Dimerinteraktionsfläche der AuLOV-Domäne.....	91
6.2 Das divergente Photoschaltverhalten der AuLOV <sup>V349W</sup> -Mutante .....	94
6.3 Einordnung der intrinsischen Degradation der AuLOV-Domäne.....	97
6.4 AuPAC, einer AuLOV <sup>V254M/V349W</sup> -cODC1 <sup>CA</sup> basierte Applikation in <i>S. cerevisiae</i> .....	100
6.5 CraCry als optogenetische Anwendung in <i>S. cerevisiae</i> .....	103
7 Ausblick und Fazit .....	106
8 Literaturverzeichnis.....	107

## *Inhaltsverzeichnis*

9 Anhang .....	119
9.1 Abbildungen .....	119
9.2 Tabellen .....	123
9.3 Abkürzungen für Aminosäuren .....	124
9.4 Abkürzungen .....	125
Danksagung .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## **1 Einleitung**

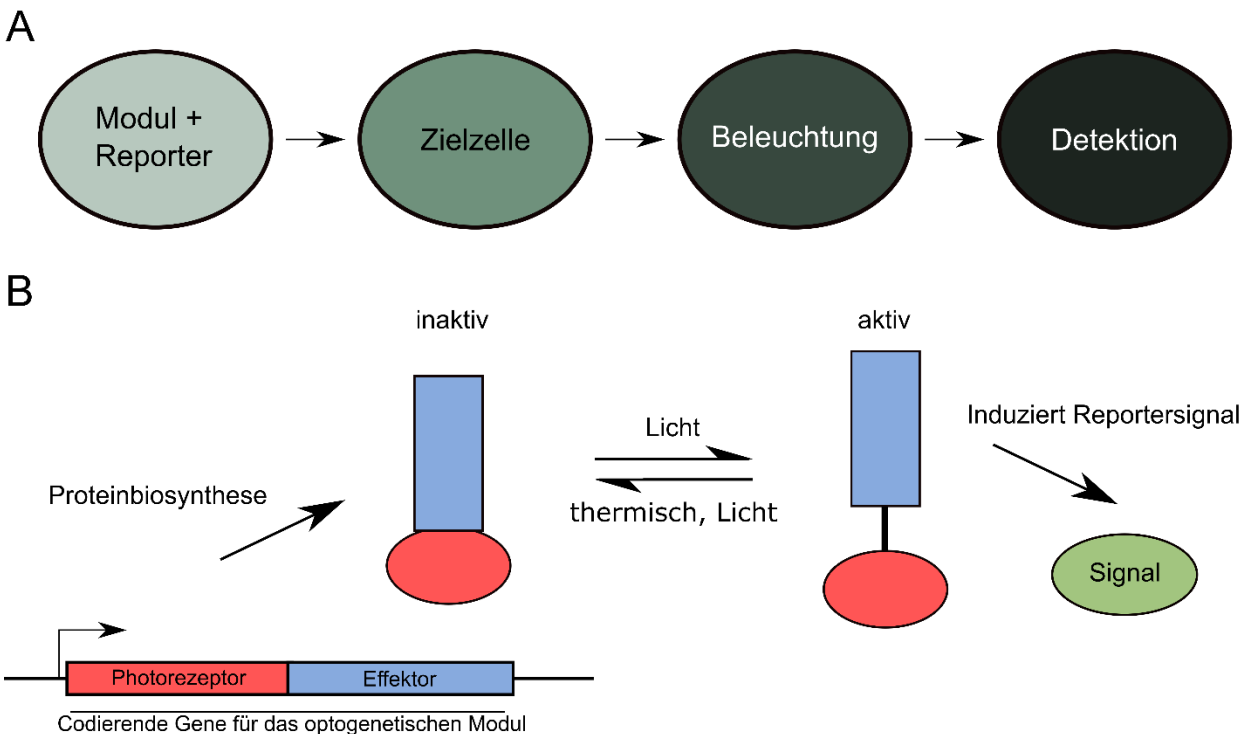
Am Anfang befasst sich die Einleitung mit der Optogenetik im Allgemeinen und stellt das Feld kurz vor. Anschließend werden der Ubiquitin-abhängige und -unabhängige Proteinabbau vorgestellt sowie synthetische und optogenetischen Applikationen, die auf diesen Proteinabbauwegen beruhen. Abschließend werden die Photorezeptoren (LOV-Domänen und Cryptochrome) sowie die Adenylatcyclasen vor allem bPAC, vorgestellt.

### **1.1 Optogenetik - Ein Überblick**

Optogenetik bezieht sich auf die Anwendung von synthetischen, lichtgesteuerten Proteinen zur Kontrolle von Prozessen in lebenden Zellen<sup>1</sup> und setzt sich aus den Wörtern „optisch“ und „Genetik“ zusammen.<sup>2</sup> Von LAWRENCE und O'BANION wurde der Begriff Optogenetik als ein Feld der Wissenschaft, das sich mit genetisch kodierten lichtgesteuerten Protein beschäftigt, definiert.<sup>3</sup> Allein zwischen 2006 und 2018 wurden 600 Reviews bezüglich Optogenetik veröffentlicht, was ein breit gefächertes Feld mit unzähligen Anwendungen und deren Bedeutung für die Forschung verlauten lässt.<sup>3</sup> Die Ursprünge der Optogenetik liegen in den 70er Jahren, durch die Entdeckung der Opsine<sup>3</sup> und die ersten Ideen zur Entwicklung von lichtgesteuerten Ionenkanälen, um neuronale Prozesse besser zu verstehen.<sup>1</sup> Mit zunehmender Zeit kamen Anwendungen außerhalb der Neurowissenschaften hinzu, wie z.B. die Steuerung von Zellfunktionen auf genetischer Ebene.<sup>4,5</sup> Das Anwendungsgebiet der Optogenetik beschränkt sich seit den letzten zehn Jahren nicht mehr länger auf neuronale Zellen, sondern erstreckt sich auch über weitere Bereiche des Lebens, wie zum Beispiel Prokaryonten, Hefen, Säugerzellen und andere eukaryotische Zellen.<sup>4-6</sup> Es gibt eine Fülle von verschiedenen optogenetischen Anwendungen, welche auf den gleichen Prinzipien beruhen. Von PASTRANA wurde das Vorgehen bei optogenetischen Experimenten beschrieben (**Abbildung 1 A**). An erster Stelle steht die Wahl des Moduls, meist ein Photorezeptor in Kombination mit einer Effektdomäne<sup>7</sup>. Die Literatur bietet hierzu eine Vielzahl an bekannten Photorezeptoren, wie zum Beispiel LOV-Domänen, Cryptochrome, Phytochromen, etc.<sup>3</sup> Die Wahl des Reporters fällt auch in diesen Schritt.<sup>7</sup> Als Reporter werden oft fluoreszierende Proteine verwendet<sup>2</sup>, da diese mit einer Vielzahl von Methoden verfolgt werden können. Im nächsten Schritt erfolgt das Einbringen in die Zielzelle auf Genebene und die Expression des Zielproteins.<sup>7</sup> Anschließend kommt die Wahl der experimentellen Bedingungen, zu dem auch das Finden der Gesamtbedingungen für das Experiment

## 1 Einleitung

gehört, wie zum Beispiel Wachstums- und Beleuchtungsbedingungen.<sup>7</sup> Schlussendlich kommt die Detektion, d.h. der Einfluss des Moduls auf das System wird analysiert.<sup>7</sup> Eine einfache optogenetische Anwendung könnte wie folgt aussehen: Nach der Translation der Gene des Moduls, welches aus einem Photorezeptor (Sensor) und einem Effektor besteht, wird dieses durch einen Lichtreiz aktiviert und induziert über den Effektor ein Reportersignal. Das Reportersignal lässt sich anschließend detektieren (**Abbildung 1 B**). In Dunkelheit konvertiert das Modul wieder in seinen inaktiven Zustand zurück.



**Abbildung 1:** A: Schematische Ablauf eines optogenetischen *in vivo* Experiments. Als Erstes steht die Wahl des optogenetischen Moduls und des Reporters, gefolgt von dem Einbringen in die Zielzelle auf Genebene. Anschließend folgt das Finden der idealen Beleuchtungsbedingungen, abschließend steht die Durchführung der Datenerzeugung. B: Schematische Darstellung eines fiktiven optogenetischen Beispiels. Die Gene des Moduls werden durch die Proteinbiosynthese translatiert. Das Modul besteht aus einem Photorezeptor und einem Effektor. Durch einen Lichtreiz, wird das Modul aktiviert, welcher im aktiven Zustand anschließend ein Reportersignal induziert. Dieses Signal lässt sich anschließend detektieren. (Basierend auf Hasenjäger *et al.*<sup>8</sup>)

Wie bereits erwähnt, gibt es eine Vielzahl von Proteinen die ihre Anwendung als Aktoren in der Optogenetik finden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Photorezeptoren, die meistens aus Pflanzen oder Mikroorganismen stammen.<sup>9</sup> Die Photorezeptoren beherbergen ein Chromophor, welches bei spezifischen Wellenlängen Licht absorbiert und auf diese Art und Weise aktiviert wird. Die bekannten einzelnen Photorezeptoren decken das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichtes

## 1 Einleitung

ab.<sup>3,9,10</sup> Beliebte Photorezeptoren sind z. B. die blaulichabsorbierenden Flavoproteine, wie die LOV-Domänen, Cryptochrome oder BLUF-Domänen (**Tabelle 1**).<sup>3</sup> Rhodopsine sind ein beliebtes Ziel für die Optimierung von Ionenkanälen, um den Ionentransport mittels Licht zu steuern. Abschließend sind die rotlichtabsorbierenden Phytochrome zu nennen (**Tabelle 1**). Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bekanntesten Photorezeptoren, die in der Optogenetik Anwendung finden.<sup>3</sup>

**Tabelle 1:** Überblick über die bekanntesten Photorezeptoren (LOV = light-oxygen-voltage BLUF = blue-light using FAD, OCP = orange carotenoid protein, PYP = photoactive yellow protein, UVR = UV-repair protein).<sup>3,11,12</sup>

Photorezeptor	Chromophor / Cofaktor	Absorptionsbereich / nm
LOV-Domänen	FMN /FAD	440 - 470
BLUF-Domäne	FMN /FAD	440 - 470
Cryptochrome	FMN /FAD	440 - 470
Rhodopsine	Retinal	400 - 600
B <sub>12</sub> -Rezeptoren	B <sub>12</sub>	300 - 570
OCP	β-Carotin	450 - 550
PYP	p-Hydroxycoumarinsäure	446 (max.)
UVR	Tryptophan	280 - 320
Phytochrome	Biliverdinderivate	620 - 690

## 1.2 Proteinabbau und dessen Anwendung in der synthetischen Biologie

In Eukaryonten kann der Proteinabbau über zwei verschiedene Wege erfolgen, den Ubiquitin-abhängigen bzw. den Ubiquitin-unabhängigen Abbauweg. Beide Wege unterscheiden sich dadurch, dass der Ubiquitin-abhängige Abbau durch Polyubiquitinierung oder der Ubiquitin-unabhängige über eine Degradationssequenz erfolgt;<sup>13</sup> wogegen das Ergebnis dasselbe ist, nämlich der Abbau von Proteinen durch das Proteasom.<sup>13</sup>

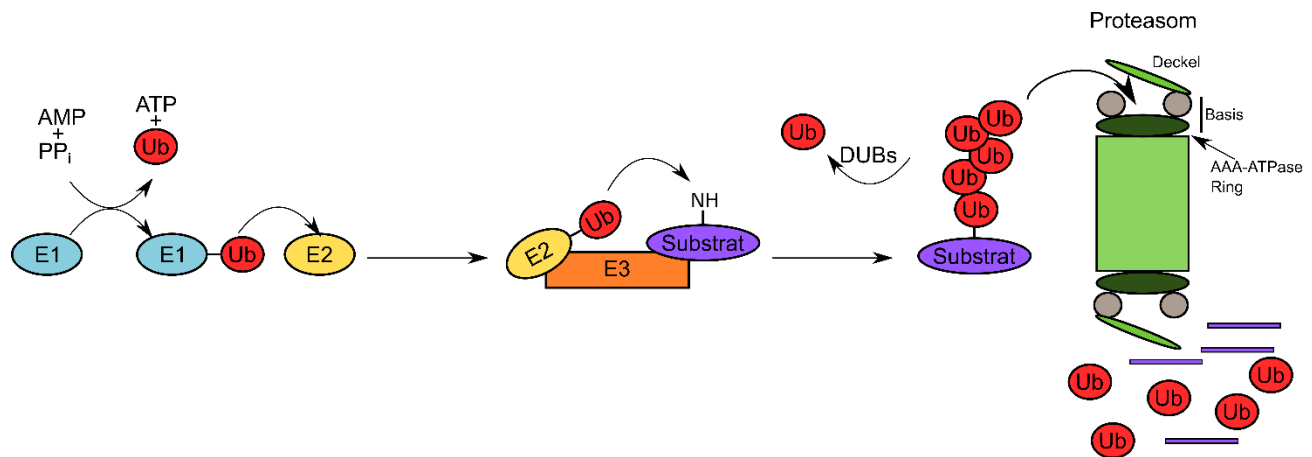
### 1.2.1 Ubiquitin-abhängiger Proteinabbau

Grundlage des Ubiquitin-abhängigen Abbaus ist das Ubiquitin-Proteasom-System. In diesem System wird eine Polyubiquitinkette am Zielprotein als Initiator für den Abbau durch das Proteasom erkannt.<sup>14</sup> Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren großes Protein, welches als posttranslationale Modifikation über



## 1 Einleitung

Ubiquitin-Ligasen an Proteine geheftet wird. Durch die Initiierung des proteasomalen Abbaus besitzt Ubiquitin regulierende Funktionen,<sup>14</sup> wie z.B. die Involvierung in die Endozytose und die Regulation von Rezeptoren und Transportern.<sup>15</sup> Für die Ubiquitinierung von Proteinen ist ATP notwendig, welches zur Übertragung von Ubiquitin (Ub) auf das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) verbraucht wird (**Abbildung 2**). Bei dieser Übertragung wird ATP zu AMP und Pyrophosphat umgesetzt. Ubiquitin bildet über sein terminales Glycin einen Thioester mit dem reaktiven Cystein des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms.<sup>14,16,17</sup>



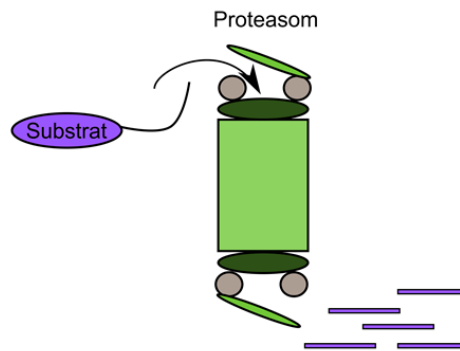
**Abbildung 2:** Ubiquitin-abhängiger Proteinabbau. Unter Verbrauch von ATP wird das Ubiquitin (Ub) auf das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) übertragen. Von E1 erfolgt die Übertragung auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2). Anschließend erfolgt durch die Ubiquitinproteinligase (E3) die Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat. Nun erfolgt entweder der Abbau durch das Proteasom oder es kommt durch das Deubiquitinierungsenzym zur Entfernung des Ubiquitins vom Substrat. (Nach Trauth *et al.*<sup>14</sup> und Finley *et al.*<sup>18</sup>)

Anschließend wird das aktive Ubiquitin auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen, welches wieder durch einen Thioester gebunden wird (**Abbildung 2**).<sup>14,16,17</sup> Mittels der Ubiquitinproteinligase (E3) erfolgt die Auswahl des Substrates. Zusammen mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) überträgt die Ubiquitinproteinligase (E3) das Ubiquitin auf das Substrat. Dabei wird eine Isopeptidbindung zwischen einem Lysin des Substrats und dem terminalen Glycin des Ubiquitins gebildet. Bei der Polyubiquitinierung werden weitere Ubiquitinmoleküle in einer kettenartigen Struktur aneinandergereiht, was wiederum über die Verknüpfung mit einem Lysin des Ubiquitins erfolgt (**Abbildung 2**).<sup>14–17</sup> Gegenläufig arbeitet das Deubiquitinierungsenzym, welches in der Lage ist Ubiquitin wieder von dem Substrat zu lösen und somit Polyubiquitinketten aufzubrechen.<sup>14–17</sup> Bei dem Proteasom handelt es sich um einen Komplex aus mehreren Untereinheiten.<sup>14–17</sup> Kernstück ist der proteolytische Kern<sup>14</sup>, der für die Proteolyse der Polypeptidkette des Substrats verantwortlich ist. Das polyubiquitinierte Substrat wird von der AAA-ATPase erkannt

(**Abbildung 2**).<sup>14</sup> Anschließend wird die Peptidkette in den proteolytischen Kern gezogen und in Fragmente zerlegt (**Abbildung 2**).<sup>14</sup> Am Deckel des Proteasoms wird die Polyubiquitinkette gebunden und mit Hilfe des Deubiquitinierungsenzyms wieder in monomeres Ubiquitin zurückgeführt.<sup>14</sup>

### 1.2.2 Ubiquitin-unabhängiger Proteinabbau

Für den Ubiquitin-unabhängigen Proteinabbau ist eine spezifische Erkennungssequenz am Protein notwendig um von dem Proteasom erkannt zu werden. Außerdem muss eine vollständige bzw. partielle Entfaltung des Proteins für die Ubiquitin-unabhängigen Degradation vorliegen (**Abbildung 3**).<sup>13</sup>



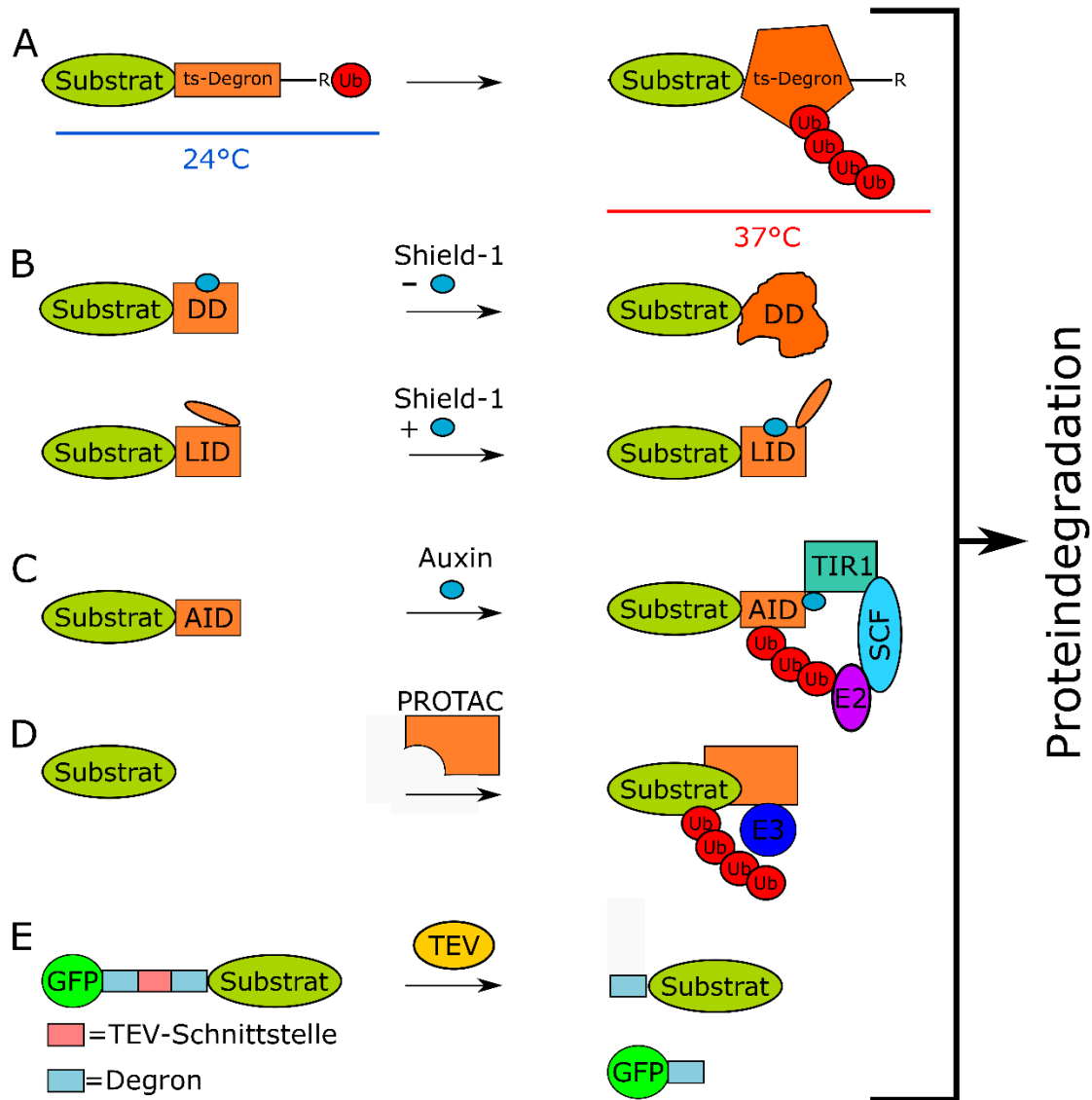
**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Ubiquitin-unabhängigen Proteinabbaus durch das Proteasom. Das Substrat wird direkt vom Proteasom über die entfaltete Erkennungssequenz (Degron) erkannt. (Basierend auf Trauth et al.<sup>14</sup>)

Diese speziellen Erkennungssequenzen werden auch als Degron bezeichnet. Ein bekanntes Beispiel ist das Protein Rpn4, welches über beide Wege abgebaut werden kann.<sup>19</sup> Für den Ubiquitin-unabhängigen Abbau ist eine N-terminale Degronsequenz verantwortlich.<sup>19</sup> Eine der bekanntesten C-terminalen Erkennungssequenzen, stammt aus der Ornithindecaboxylase und besteht aus 37 Aminosäuren.<sup>20,21</sup> Das Cystein-Alanin-Motiv, welches 19 Aminosäuren vom C-terminus entfernt lokalisiert ist, wird von dem Antizym erkannt, welches die Degradation durch das Proteasom initiiert.<sup>13,20,21</sup> Bei dem Antizym handelt es sich um ein Protein, welches mit der Ornithindecaboxylase Heterodimere ausbildet.<sup>22</sup> Über die Heterodimere, wird die Ornithindecaboxylase dem Proteasom zugeführt.<sup>22</sup> Das Antizym selbst wird nicht über das Proteasom abgebaut.<sup>22</sup> Polyamine führen zu einer *feedback* Hemmung des Antizym, sodass sich das Antizym vom Proteasom löst.<sup>22</sup>

### 1.2.3 Synthetische Proteindegradationssysteme

Basierend auf den beiden vorgestellten Wegen des Ubiquitin-abhängigen und Ubiquitin-unabhängigen Proteinabbaus wurden einige Systeme entwickelt, um die Proteinlevel ausgewählter Proteine zu kontrollieren. Dazu bediente man sich verschiedener Stimuli, um die Degradation zu initiieren, wie zum Beispiel Temperatur oder Licht. Basierend auf dem Ubiquitin-abhängigen Abbau wurde 1994 das temperatursensitive Degron entwickelt (**Abbildung 4 A**).<sup>23</sup> Es handelt sich dabei um ein N-terminales Degron in dem N-terminal die Dihydrofolatereduktase, welches als eigentliches Degron dient, an das Zielprotein fusioniert wurde.<sup>14,24</sup> Niedrige Temperaturen (ca. 23 °C) tragen zur Stabilisierung des Fusionskonstrukts bei, da es nur zur einfachen Ubiquitinierung des N-terminalen Arginins kommt (**Abbildung 4 A**).<sup>14,24</sup> Bei höheren Temperaturen (37 °C) wird dieses Ubiquitin entfernt, wodurch es zur Destabilisierung und zur Erkennung der Sequenz durch die Ubiquitinproteinligase (E3) kommt (**Abbildung 4 A**).<sup>14,24</sup> Dies induziert die Polyubiquitinierung der Dihydrofolatereduktase und das Konstrukt wird dem proteasomalen Abbau zugeführt (**Abbildung 4 A**).<sup>14,24</sup> Eine weitere Möglichkeit ist es mit Hilfe von Liganden die Stabilität eines Zielproteins zu kontrollieren. Das Rapamycinanalogon Shield-1 wirkt abhängig vom Zielprotein stabilisierend oder destabilisierend (**Abbildung 4 B**).<sup>24,25</sup> Unter Verwendung einer LID-Domäne (LID= *ligand-induced degradation*) als Zielprotein, kommt es in der Anwesenheit von Shield-1 zum Abbau des Konstrukts durch das Proteasom (**Abbildung 4 B**).<sup>24,25</sup> Bei der LID-Domäne handelt es sich um eine Variante des FKBP12 Proteins, in dessen Rapamycinbindetasche die Degronsequenz verborgen ist.<sup>24,25</sup> Durch die Anwesenheit von Shield-1 wird das Degron aus der Tasche verdrängt und der Abbau induziert (**Abbildung 4 B**).<sup>24,25</sup> Parallel zum induzierten Proteinabbau durch Shield-1 wurde auch eine proteinstabilisierende Variante entwickelt. An Stelle der LID-Domäne wurde eine Degrondomäne an das Zielprotein fusioniert, welche normalerweise für den proteasomalen Abbau sorgt.<sup>14,24,25</sup> Bei der Anwesenheit von Shield-1 kommt es zur Stabilisierung der Degrondomäne; dies verhindert so den Abbau durch das Proteasom (**Abbildung 4 B**).<sup>14,24,25</sup> Basierend auf dem von Pflanzen verwendeten Degradationsweg wurde das Auxin induzierte Degron (AID-Degron) von *Kanemaki* entwickelt (**Abbildung 4 C**).<sup>14,24,26</sup> Bei Auxinen handelt es sich um eine Familie von Pflanzenhormonen.<sup>24,26</sup> Das Hormon Auxin bindet an das TIR1-Protein, welches sich mit dem SCF-Komplex (bestehend aus den Proteinen Skp1, Cullin und F-box) zusammenlagert und an das AID-Degron bindet (**Abbildung 4 C**).<sup>14,24,26</sup> An diesen Komplex bindet das E2 Enzym aus dem Ubiquitin-abhängigen Proteinabbauweg an, was zur Polyubiquitinierung und somit zum Abbau des Zielproteins leitet (**Abbildung 4 C**).<sup>14,24,26</sup>

Mit sogenannten PROTACS Molekülen (*Proteolysis-targeting Chimeric*), welche sich ähnlich wie das zuvor beschriebene AID-System verhalten, wird über ein chimäres Molekül der Abbau herbeigeführt (**Abbildung 4 D**).<sup>14,24</sup> Dieses chimäre Molekül hat sowohl zu dem Substrat als auch zum E3-Enzym eine hohe Affinität und führt so die Polyubiquitinierung und den Abbau herbei (**Abbildung 4 D**).<sup>14</sup>



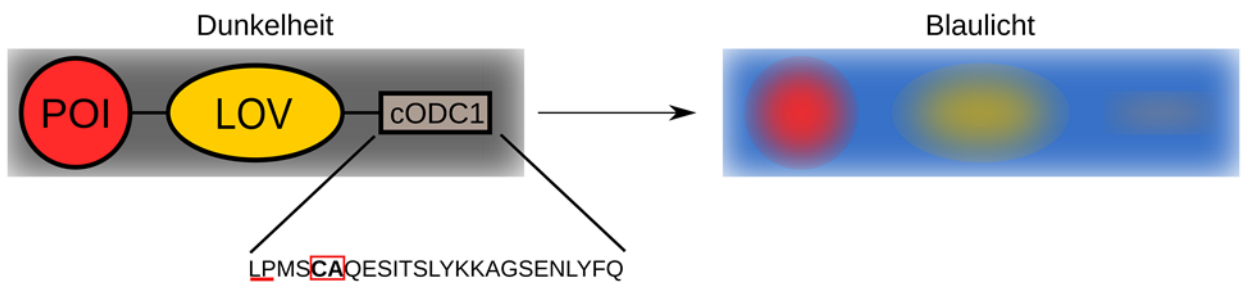
**Abbildung 4:** Synthetische Proteindegradationssysteme. **A:** Das temperatursensitive Degron, welches aufgrund der Temperaturerhöhung ein ubiquitin-abhängige Degradation einleitet. **B:** Die Shield-1 basierten Degradationssysteme. Einerseits wirkt Shield stabilisierend, indem es an die Destabilisierungssequenz bindet (DD) und so die Degradation unterbindet. Andererseits wirkt Shield destabilisierend, da es durch Bindung an die LID-Domäne die Degradation vom Zielprotein induziert. **C:** Das Auxin basierte AID-Degron. Auxin rekrutiert TIR1 und den SCF-Komplex und induziert so den ubiquitin-abhängigen Abbau. **D:** Das PROTAC basierte Degradationssystem, induziert die Degradation aufgrund der Affinität von PROTAC zu dem E3-Enzym, des ubiquitin-abhängigen Abbauges. **E:** Das TIPI-System ist abhängig von der TEV-Protease. Die TEV-Protease legt durch Spaltung der TEV-Schnittstelle die Degradationssequenzen frei. (Nach Trauth et al. und Natsume et al.)<sup>14,24</sup>

## 1 Einleitung

Eine weitere Möglichkeit die Proteolyse herbeizuführen ist die Verwendung von Nanobodies, welche auf dem Prinzip von Antikörpern beruhen.<sup>14</sup> Diese Nanobodies binden an eine spezifische Proteinsequenz oder Epitop.<sup>14</sup> Gleichzeitig ist SCF in der Lage mit ihnen zu interagieren, was eine Kombination mit dem AID-System erlaubt.<sup>14</sup> Ein anderes System zur Kontrolle der Proteinmenge ist das TIPI-System (*Tobacco etch virus* (TEV) *protease-induced protein instability*), welches auf der Verwendung eines N-terminalen und C-terminalen Degrons basiert (**Abbildung 4 E**).<sup>14,24</sup> Die beiden Degradationssequenzen verbinden Substrat und Reporter über eine TEV-Protease-Schnittstelle.<sup>14,24</sup> Durch die Anwesenheit einer TEV-Protease, werden die beiden Degronsequenzen durch proteolytische Spaltung freigelegt und es kommt zum Abbau über das Proteasom (**Abbildung 4 E**).<sup>14,24</sup> Die Kombination von Photorezeptoren und Degronsequenzen führt zu lichtgesteuerten Degronmodulen. Hier sind das B-LID (blaulichtinduzierte Degron) und das photosensitive Degronmodul bekannt.<sup>14,24</sup> Auf Letzteres wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

### 1.2.4 Das photosensitive Degronmodul

Das photosensitive Degronmodul wurde 2013 von *Renicke et al.* in *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt und basiert auf einer Degronsequenz, die mit einer LOV-Domäne (*light-oxygen-voltage*) fusioniert ist.<sup>6</sup> Bei der Degronsequenz handelt es sich um das *ODC-like*-Degron (cODC1) von *Jungbluth et al.*<sup>27</sup>, welche an die C-terminale J $\alpha$ -Helix der LOV2-Domäne von *Arabidopsis thaliana* (*AtLOV2*) fusioniert wurde.<sup>6</sup> Die *AtLOV2* enthält ein FMN Chromophor als Cofaktor, was sie sensitiv für Blaulicht macht (siehe Kapitel LOV-Domänen). Die Beleuchtung mit Blaulicht führt zu strukturellen Änderungen, sodass sich die J $\alpha$ -Helix entfaltet, wodurch das Degron freigelegt wird und es zum proteasomalen Abbau kommt (**Abbildung 5**).<sup>6</sup> Getestet wurden verschiedene Varianten und die besten Ergebnisse wurden mit einem helix-aufbrechenden Motiv vor der Degronsequenz mit einer Länge von 23 Aminosäuren erzielt.<sup>6</sup>



## 1 Einleitung

**Abbildung 5:** Das photosensitive Degron ist in der Dunkelheit inaktiv, die C-terminale J $\alpha$ -Helix ist gefaltet und entfaltet erst unter Blaulichtbeleuchtung. So wird die Degronsequenz durch das Entfalten der J $\alpha$ -Helix unter Blaulicht freigelegt und der Abbau des Proteins erfolgt über das Proteasom. POI (*protein of interest*) steht stellvertretend für ein beliebiges Zielprotein.

Das für die Erkennung relevante Cystein-Alanin-Motiv (CA-Motiv) sitzt wie bei der Ornithindecarboxylase 19 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt<sup>6</sup> (**Abbildung 5**) und wird durch das Antizym erkannt und so dem Ubiquitin-unabhängigen Proteinabbau durch das Proteasom zugeführt.<sup>20,21</sup> Durch die Mutation dieses CA-Motives zu einem Alanin-Alanin-Motiv lässt sich das photosensitive Degronmodul inaktivieren.<sup>6</sup> In der zweiten Generation des photosensitiven Degronmoduls wurde nach Varianten mit einem höheren Schalfaktor zwischen Dunkelheit und Blaulicht gesucht als in der von *Renicke et al.* publizierten ersten Generation.<sup>28</sup> Ziel war es, den blaulicht-aktivierten Zustand weiter zu destabilisieren.<sup>28</sup> Von *Usherenko et al.* wurden in der zweiten Generation des photosensitiven Degronmoduls fünf Varianten der AtLOV2-Domäne mit einem signifikant besseren Schalfaktor erzeugt als in der ersten Generation. Dazu wurden gezielt Mutationen in der J $\alpha$ -Helix Region sowie zufällige Mutationen erzeugt.<sup>28</sup> Die Variante AtLOV2<sup>K92R/E132A/E155G</sup> zeigte die größte Verbesserung zu dem psd-Modul der ersten Generation.<sup>28</sup> Für die Entwicklung der dritten Generation des photosensitiven Degronmoduls wurden von *Hasenjäger und Trauth et al.* die AtLOV2 durch LOV-Domänen von anderen Organismen ersetzt und getestet. Die meisten LOV-Domänen zeigten ähnliches Verhalten wie die bekannte AtLOV2 im photosensitiven Degronmodul.<sup>29</sup>

**Tabelle 2:** Vergleich der verschiedenen Generationen des photosensitiven Degronmoduls, alle Experimente wurden in *S. cerevisiae* durchgeführt. Die Parameter sind der Publikation von *Hasenjäger und Trauth et al.*<sup>29</sup> entnommen.

	LOV-Domäne	Schaltrate	Halbwertszeit		Publikation	
		Dunkelheit/Blaulicht	Dunkelheit /min	Blaulicht /min	Jahr	Autor
1	AtLOV2	~4	123 +/- 21	20 +/- 1	2013	Renicke et al. <sup>6</sup>
2	AtLOV2 <sup>K92R/E132A/E155G</sup>	~10	102 +/- 41	12 +/- 1	2014	Usherenko et al. <sup>28</sup>
3	AsLOV3 <sup>iLIDA146A</sup>	~42	44 +/- 6	5 +/- 0,2	2019	Hasenjäger und Trauth et al. <sup>29</sup>

Eine für die Dimerisierung optimierte Variante der LOV2-Domäne von *Avena sativa* (AsLOV2) zeigt einen sehr hohen Schalfaktor zwischen Blaulicht und Dunkelheit von einem Faktor über 40.<sup>29</sup> Bei dieser Variante handelt es sich um AsLOV2<sup>iLIDA146A</sup>, bei der das Alanin 146 deletiert wurde.<sup>29</sup> Anschließend wurde ein Vergleich der verschiedenen Generationen des photosensitiven

## *1 Einleitung*

Degronmoduls unter gleichen Bedingungen durchgeführt (**Tabelle 2**).<sup>29</sup> Das photosensitive Degronmodul in der dritten Generation zeigt eine eindeutige Schaltfaktorverbesserung gegenüber der zweiten Generation (**Tabelle 2**).

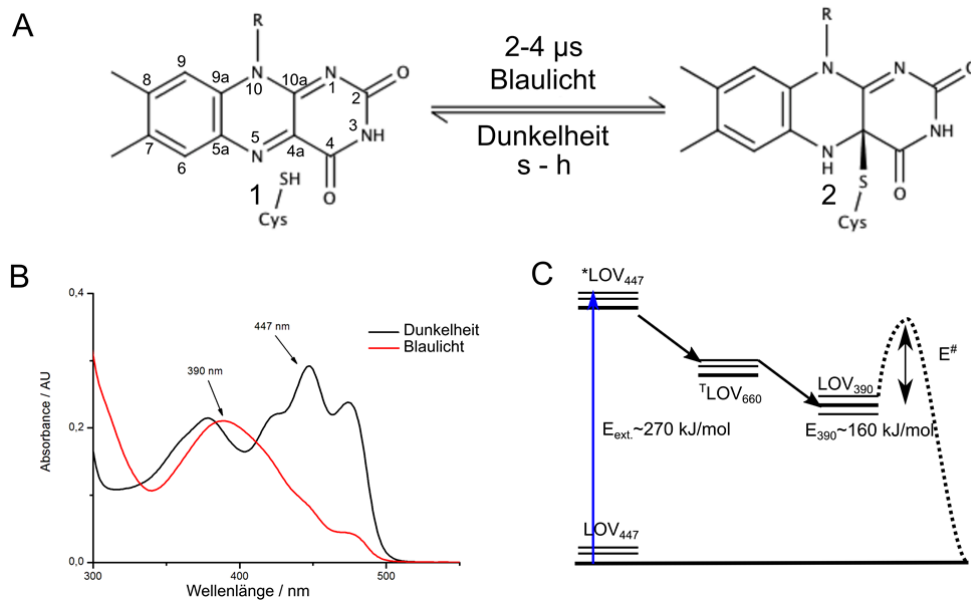
## 1.3 LOV-Domänen

### 1.3.1 LOV-Domänen im Allgemeinen

LOV-Domänen sind blaulichtsensitive Photorezeptoren. Diese zählen zu den Flavoproteinen und enthalten entweder FMN oder FAD als Cofaktor.<sup>30,31</sup> Die Abkürzung LOV steht für „*light-oxygen-voltage*“, was sich auf ihre Funktion als blaulichtsensitiver Photorezeptor bezieht.<sup>30,31</sup> Proteine, die LOV-Domänen enthalten, kommen in Pflanzen, Bakterien, Pilzen und Algen vor.<sup>31</sup> Als Sensordomäne sind sie mit einer Effektdomäne verknüpft und so in die Signalweiterleitung involviert.<sup>32</sup> Effektdomänen können zum Beispiel DNA-Bindemotive<sup>33,34</sup> oder Kinasen sein.<sup>30,31</sup> Funktionen, in deren Steuerung LOV-Domänen involviert sind, sind zum Beispiel der Phototropismus, die Transkription und der zirkadiane Rhythmus.<sup>32,35</sup> Von *Glantz et al.* wurden 2016 mittels bioinformatischen Methoden über 6700 neue, nicht charakterisierte LOV-Domänen vorhergesagt.<sup>30</sup> Strukturell gehören die LOV-Domänen mit ihrem strukturell konservierten PAS-Faltungsmotiv (PER-ARNT-SIM), in dem ebenfalls ein Cofaktor gebunden ist, der PAS-Superfamilie an.<sup>31</sup> Das PAS-Faltungsmotiv besteht aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Strängen und vier  $\alpha$ -Helices ( $A\beta$ - $B\beta$ - $C\alpha$ - $D\alpha$ - $E\alpha$ - $F\alpha$ - $G\beta$ - $H\beta$ - $I\beta$ )<sup>36,37</sup> und ist von einer C-terminalen Helix ( $J\alpha$ ) flankiert, welche sich in Abhängigkeit von Blaulicht entfaltet.<sup>36,37</sup> In diesem PAS-Faltungsmotiv ist der Flavin Cofaktor nichtkovalent gebunden. Durch Bestrahlung mit Blaulicht kommt es zur Ausbildung eines C4(a)-Addukts zwischen dem konservierten Cystein in der  $E\alpha$ -Helix mit dem Isoalloxazin-Ring des Flavins.<sup>31,38</sup> Die Ausbildung des Thioethers (C4(a)-Addukt) läuft bei den meisten LOV-Domänen sehr rasch ab, wohingegen die Rückreaktion auf einer Zeitskala von Sekunden und Stunden ablaufen kann (**Abbildung 6 A**).<sup>38</sup> Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Flavins von ~450 nm (ungebundener Zustand) zu ~390 nm (gebundener Zustand) (**Abbildung 6 B**).<sup>38</sup> Der Photozyklus von LOV-Domänen ist literaturbekannt und startet immer im Dunkelizustand ( $LOV_{447}$ ). Durch Anregung mit Blaulicht mit einer Energie von etwa 270 kJ/mol erfolgt die Überführung des FMNs in den angeregten Singulettzustand ( $*LOV_{447}$ ) (**Abbildung 6 C**).<sup>38</sup> Dieser Singulettzustand geht durch Interkonversion sehr schnell in den rotverschoben Tripletzustand ( $TLOV_{660}$ ) (**Abbildung 6 C**). In wenigen Mikrosekunden bildet sich der Lichtzustand ( $LOV_{390}$ ) aus, in dem etwas mehr als 160 kJ/mol Anregungsenergie gespeichert sind (**Abbildung 6 C**).<sup>38</sup>



## 1 Einleitung



**Abbildung 6:** Der Flavin-Chromophor in der LOV-Domäne. **A:** Isoalloxazin-Ring des ungebundenen Flavincofaktors (1), durch Anregung mit Blaulicht bildet sich das C4(a)-Addukt (2) aus. **B:** Exemplarische UV/VIS-Spektren einer LOV-Domäne im Dunkenzustand (schwarz) mit einem Maximum bei ~450 nm und im Lichtzustand (rot) mit einem Maximum bei ~390 nm. **C:** Energieschema zur Beschreibung eines allgemeinen Photozyklus einer LOV-Domäne. (Nach Losi und Gärtner<sup>38</sup>).

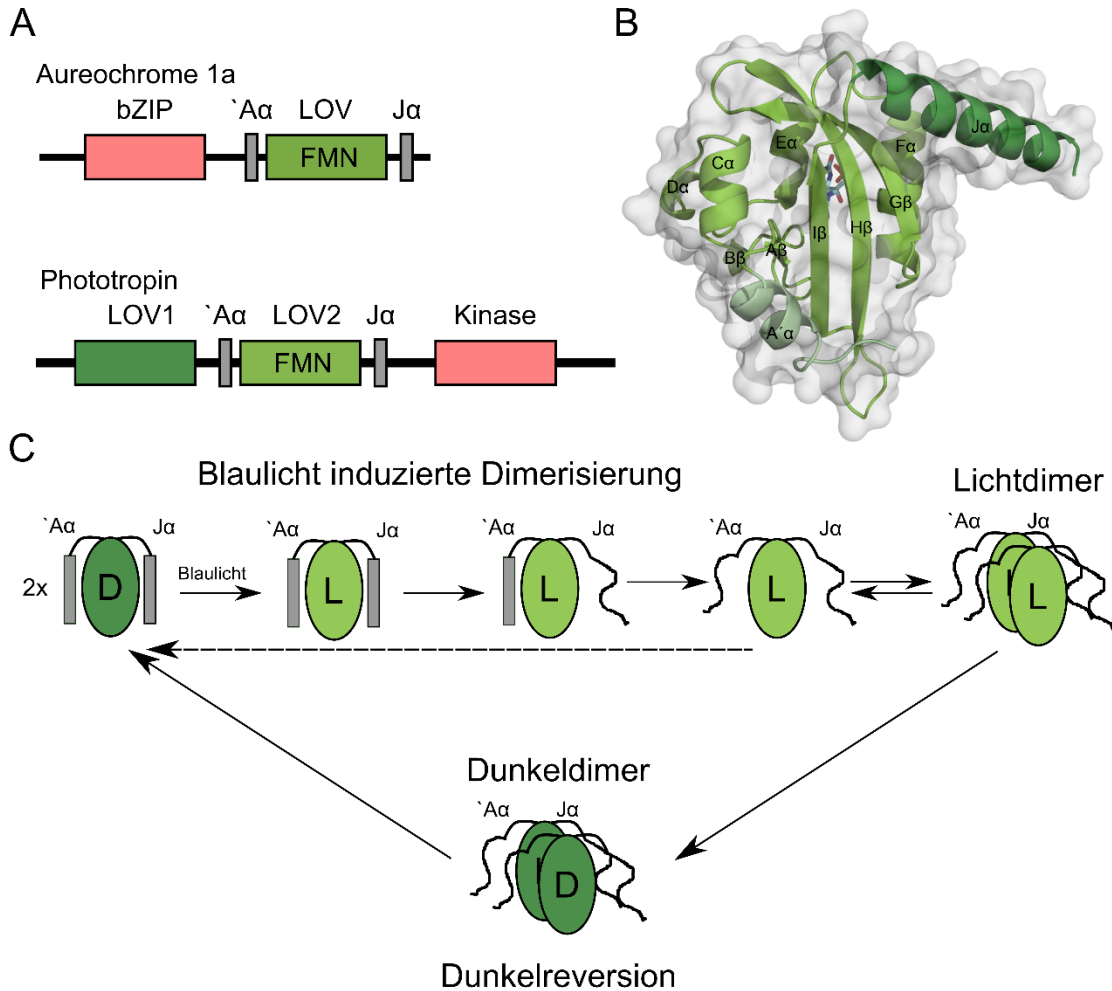
Für die Relaxation in den Dunkenzustand muss eine Barriere von etwa 100 kJ/mol überwunden werden.<sup>38</sup> Aufgrund der selektiven Blaulichtsensibilität, geringen Größe und dem sehr gut untersuchten Photozyklus, sind LOV-Domänen ein beliebter Ausgangspunkt für Proteindesign sowie für optogenetische Anwendungen. Um das Anwendungsspektrum und die Funktionalität der LOV-Domänen zu erweitern, wurden *in vivo*, *in vitro* und *in silico* mehrere Ansätze verfolgt. Die Fluoreszenz der *At*LOV2 wurde zum Beispiel über gerichtete Mutagenese verbessert.<sup>39</sup> Dieser so entstandene Fluorophor wird als iLOV bezeichnet.<sup>39</sup> Als Vorteil von iLOV gegenüber den herkömmlichen Fluoreszenzproteinen wurde die geringe Molekularmasse unter 20 kDa genannt.<sup>39</sup> *In silico* wurden LOV-Domänen erzeugt, deren  $\alpha$ -Helix mit Resten der ipaA-Domäne ersetzt wurden, um anschließend an den Bindungspartner der ipaA-Domäne unter Blaulicht zubinden.<sup>40</sup> Strukturbasierte Studien wurden ebenfalls vorangetrieben, um die DNA-Bindung der Aureochrome 1a und 1c zu untersuchen.<sup>33,41</sup> Auch Fusionsproteine mit dem neurotoxischen Botulinumtoxin Typ B (BoNT/B) wurden auf einen iLID basierten System erzeugt, um die C- und N-terminalen Hälften des Toxin in Lichtabhängigkeit zusammenzuführen.<sup>42</sup> Dies führt zur lichtabhängigen Freisetzung von Neurotransmittern.<sup>42</sup> Bei iLID handelt es sich um ein „*improved light induced dimer*“.<sup>43</sup> Dazu wurde das SsrA-Peptid in die C-terminale  $\alpha$  Helix der *As*LOV2 Domäne eingebaut.<sup>43</sup> Aufgrund der erhöhten

Zugänglichkeit des Peptids unter Blaulicht, wurde die Ausbildung von Dimeren mit dem Interaktionspartner SsrB licht-abhängig um den Faktor 50 gesteigert.<sup>43</sup>

### 1.3.2 Die AuLOV-Domäne von *Phaeodactylum tricornutum*

Aureochrome sind Blaulichtphotorezeptoren, in denen die LOV-Domäne mit einem DNA-Bindemotiv, einem bZIP (*b*asic *l*eu<sup>c</sup>*i*ne *z*ipper), verbunden ist. Aureochrome kommen in Algen und Kieselalgen vor, zum Beispiel in der Grünalge *Vaucheria frigida* und der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum*.<sup>44-47</sup> *P. tricornutum* ist eine einzellige Alge, welche in den meisten aquatischen Habitaten vorkommt, wobei sie bevorzugt in nährstoffreichen Ozeanen lebt.<sup>46</sup> In *P. tricornutum* sind vier Typen von Aureochromen bekannt; Typ 1a, 1b, 1c und 2.<sup>46</sup> Im Vergleich zu anderen Proteinen mit LOV-Domänen ist die Anordnung der Domänen in den Aureochromen invers, d.h. die Sensordomäne befindet sich am C-Terminus und die Effektordomäne am N-Terminus (**Abbildung 7 A**).<sup>44</sup> DNA-Bindungsstudien haben eine Affinität des bZIP-AuLOV Moduls aus dem Aureochroms 1a zu Aureobox- und Gbox-DNA-Sequenzen gezeigt.<sup>33</sup> Des Weiteren konnte mittels SAXS die DNA-Bindung von doppelsträngiger DNA gezeigt werden.<sup>33</sup> Die AuLOV (Aureochrom 1a LOV) Domäne ist mit 147 Aminosäuren und 17,9 kDa ein relativ kleines Protein, welches FMN als Chromophor in der Cofaktortasche bindet<sup>36,44,45</sup> und sein Absorptionsmaximum im Dunkelzustand bei 447 nm und im Lichtzustand bei 390 nm besitzt.<sup>36,44,45</sup> Wie alle LOV-Domänen besitzt auch AuLOV das strukturell konservierte PAS-Faltungsmotiv (**Abbildung 7 B**)<sup>36,45</sup>, welches N-terminal von der A'- $\alpha$ -Helix und C-terminal von der  $\alpha$ -Helix flankiert wird (**Abbildung 7 B**).<sup>36,45</sup> In der Dunkelstruktur von AuLOV konnten *Banerjee et al.* zeigen, dass der Cofaktor über ein Wasserstoffbrückennetzwerk durch die konservierten Reste (N262, N286, Q291 und Q350) gebunden ist.<sup>36</sup> Zwei Salzbrücken (R288 und R304) koordinieren an die Phosphatgruppe des FMNs.<sup>36</sup> *Herman* und *Kottke* konnten mithilfe der Größenausschlusschromatographie (SEC) zeigen, dass die AuLOV-Domäne in Lösung im Dunklen vorrangig als Monomer vorliegt und unter Blaulichtbeleuchtung als Dimer.<sup>45</sup> Weiter wurde eine Dimerisierung bei sehr hohen Konzentration (2,5 mM) im Dunkeln beschrieben.<sup>45</sup> Interessanterweise liegt die Dunkelstruktur der AuLOV-Domäne in einem Dimerzustand vor.<sup>36</sup> Zusätzlich zur Dunkelstruktur wurde von *Heintz* und *Schlichting* auch die Struktur des Lichtdimers kristallisiert,<sup>48</sup> wobei hier das C4(a)-Addukt zwischen dem Cystein 287 und dem Isoalloxazin-Ring identifiziert werden konnte.<sup>48</sup>

## 1 Einleitung



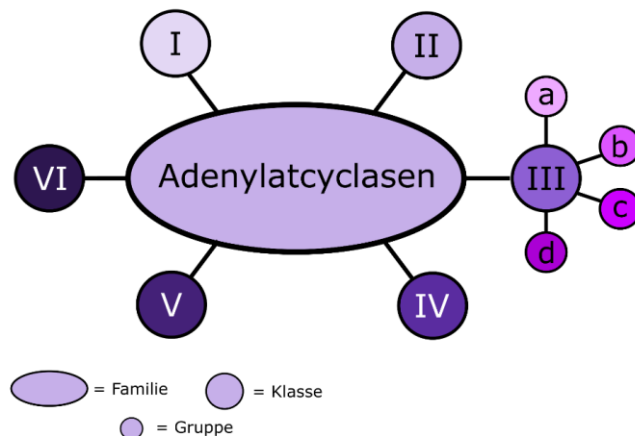
**Abbildung 7:** Die Aureochrome 1a LOV-Domäne aus *Phaeodactylum tricornutum*. **A:** Die Domänenanordnung im Aureochrome 1a ist invers im Vergleich zu anderen Proteinen mit LOV-Domänen. Die sensorische LOV-Domäne ist mit ihrem FMN Cofaktor C-terminal angeordnet, was im Vergleich zu anderen LOV-Proteinen einzigartig ist. **B:** In der Domänenarchitektur der AuLOV ist das konservierte PAS-Faltungsmotiv von der N-terminalen (A'α) und der C-terminalen Helix (Jα) flankiert. **C:** In dem Photozyklus der freien AuLOV-Domäne geht diese nach Blaulichtbestrahlung in den Lichtzustand über (C4(a)-Addukt), anschließend entfalten sich die Jα und die A'α-Helix und es bildet sich das Lichtdimer. Bevor sich dieses ausbildet, kann die angeregte AuLOV-Domäne jedoch in ihren Dunkelzustand zurückfallen. Ausgehend von dem Lichtdimer bricht das C4(a)-Addukt wieder auf und es bildet sich während der Dunkelreversion ein Dimer des Dunkelzustandes aus. Das Dimer des Dunkelzustandes zerfällt wieder in den monomeren Dunkelzustand.

Mittels spektroskopischer Methoden und SEC wurde der Photozyklus der AuLOV-Domäne von *Herman und Kottke* beschrieben (**Abbildung 7 C**).<sup>45</sup> Durch die Anregung mit Blaulicht, kommt es zur Ausbildung des Thioethers zwischen dem C4(a)-Atom des FMNs und dem Cystein 287 und die AuLOV-Domäne geht in den angeregten Singulettzustand über.<sup>45</sup> Im nächsten Schritt entfaltet sich die Jα-Helix. Dies induziert die Entfaltung der A'α-Helix, wodurch die Dimerisierungsfläche frei gegeben wird.<sup>45</sup> In diesem Zustand kann es zu einem Rückfall in den monomeren Dunkelzustand kommen, wenn sich kein Lichtdimer ausbildet.<sup>45</sup> Bildet sich das Lichtdimer aus, so kommt es zum thermischen Zerfall desselbigen im Dunkeln.<sup>45</sup> Die Thioetherbindung bricht als Erstes auf und ein

Dimer des Dunkelzustandes entsteht.<sup>45</sup> Anschließend dissoziiert das Dimer und es kommt zur Rückfaltung der flankierten Helices.<sup>45</sup> Die Rückreaktion wird als Dunkelreversion bezeichnet.<sup>45</sup>

### 1.4 Adenylatcyclasen

Adenylatcyclasen sind cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) produzierende Enzyme.<sup>49,50</sup> Bei cAMP handelt es sich um einen sekundären Botenstoff, über dessen intrazelluläres Level viele Zellfunktionen gesteuert werden.<sup>49,50</sup> Die Zellfunktionen werden über Proteine gesteuert, die spezifisch auf die Änderung des cAMP-Levels in der Zelle reagieren, wie zum Beispiel die Proteinkinase, Transkriptionsfaktoren und Ionenkanäle.<sup>49,50</sup> Adenylatcyclasen können sowohl membrangebunden als auch löslich im Zytosol vorkommen.<sup>50</sup> Adenylatcyclasen werden in sechs Gruppen eingeteilt (**Abbildung 8**), die keine Sequenzidentitäten miteinander teilen und durch unterschiedliche evolutionäre Prozesse entstanden sind.<sup>49,50</sup> Unter den verschiedenen Klassen der Adenylatcyclasen hat die Klasse III eine besondere Stellung, denn sie ist die sogenannte „universale Klasse“,<sup>49</sup> da es sich bei Klasse III um die größte, strukturell und funktional divergenteste Klasse handelt.<sup>49,50</sup> Sie lässt sich weiter in die vier Unterklassen a bis d einteilen (**Abbildung 8**).<sup>50</sup> Des Weiteren ist sie die einzige in Tieren vorkommende Gruppe der Adenylatcyclasen und hat entsprechend auch eine pharmakologische Bedeutung.<sup>50</sup>



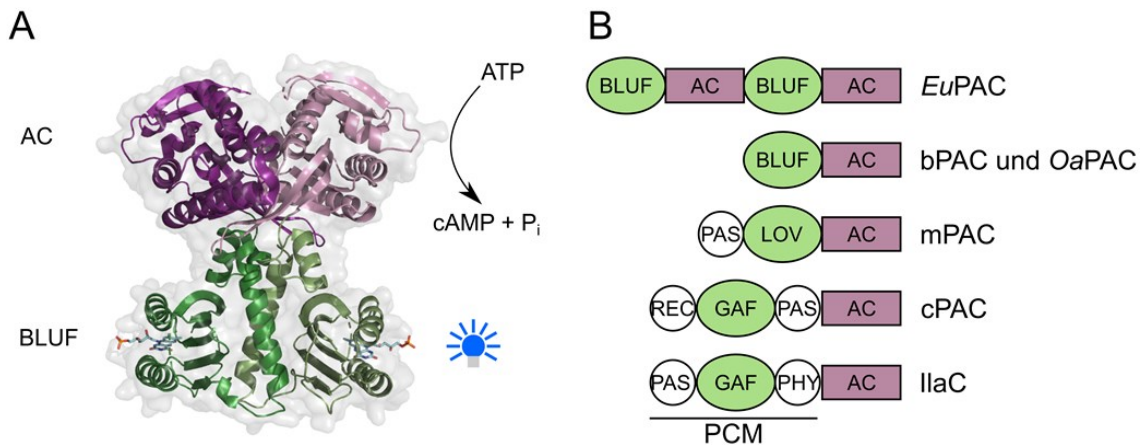
**Abbildung 8:** Übersicht über die Familie der Adenylatcyclasen; diese besteht aus sechs Klassen (I bis VI). Die dritte Klasse wird auch als universelle Klasse bezeichnet und besteht aus vier Gruppen (a bis d).

Bei den Adenylatcyclasen der Klasse III handelt es sich um Proteine, die aus mehreren Domänen bestehen<sup>50</sup> und nur als Dimer aktiv sind.<sup>49,50</sup> Durch die Dimerisierung wird eine katalytische Tasche in der Interaktionsfläche gebildet.<sup>50</sup> Als Cofaktor werden Magnesiumionen ( $Mg^{2+}$ ) oder Manganionen ( $Mn^{2+}$ ) durch zwei Aspartatreste gebunden.<sup>49,50</sup> Durch die Metallionen wird das Triphosphat des ATP

(Adenosintriphosphat) stabilisiert und der nukleophile Angriff der 3' Hydroxylgruppe der Ribose auf die  $\alpha$ -Phosphorylgruppe des Triphosphates katalysiert.<sup>49,50</sup> Dieser Angriff läuft nach einem  $S_N2$ -ähnlichen Mechanismus ab.<sup>49</sup> Nach dem Ringschluss gehen cAMP und Pyrophosphat ( $PP_i$ ) aus der Reaktion hervor.<sup>49</sup>

## 1.4.1 Die photoaktivierbare Adenylatcyclasen (PACs)

Eine besondere Art von Adenylatcyclasen der Klasse III stellen die photoaktivierbaren Adenylatcyclasen dar. Die erste photoaktivierbare Adenylatcyclase wurde in *Euglena gracilis* (EuPAC) gefunden.<sup>51</sup> Als photosensitive Domäne enthält diese eine BLUF-Domäne (*Sensor of blue-light using FAD*).<sup>52</sup> Mit EuPAC konnte das cAMP-Level in Oozyten von *Xenopus laevis*, in HEK293 Zellen und in *Drosophila melanogaster* beeinflusst werden.<sup>53</sup> Aus der bakteriellen Gattung *Beggiatoa* wurde die photoaktivierbare Adenylatcyclase bPAC isoliert, welche eine Fusion aus einer AC und einer BLUF-Domäne ist (**Abbildung 9 A, B**)<sup>54–56</sup>, wohingegen die EuPAC aus insgesamt zwei BLUF Domänen als auch aus zwei AC Domänen besteht (**Abbildung 9 B**).<sup>51</sup> Auf Grund der geringen Größe von bPAC, wird diese präferiert in optogenetischen Applikationen verwendet.<sup>54</sup>



**Abbildung 9:** Domänenstruktur von PACs mit der Adenylatcyclasendomäne in violett und der photosensitiven Domäne in grün. **A:** Model der bPAC (PDB: 5MBB).<sup>57</sup> Kette A ist in dunkleren Tönen als Kette B dargestellt. Die BLUF-Domäne (grün) mit dem FMN wird von blauem Licht angeregt, was die Adenylatcyclase (AC) stimuliert und somit Umsetzung von ATP in cAMP und Pyrophosphat auslöst. **B:** Verschiedene Domänenanordnungen von einigen literaturbekannten PACs.<sup>58,59</sup>

Strukturell wurde die bPAC von *Lindner et al.* im Dunkel- und Pseudolichtzustand beschrieben.<sup>57</sup> Bei bPAC handelt es sich um ein paralleles Homodimer, in dem die einzelnen Domänen antiparallel zueinander angeordnet sind (**Abbildung 9 A**).<sup>57</sup> Als Dimerinteraktionsfläche dient die  $\alpha 3$ -Helix der BLUF-Domäne, welche eine intermolekulare Interaktion mit der  $\alpha 3$ -Helix der gegenüberliegenden Kette eingeht.<sup>57</sup> Des Weiteren bindet die BLUF-Domäne FMN als Cofaktor.<sup>57</sup> Die

Adenylatcyclasendomäne interagiert mit der BLUF-Domäne hauptsächlich über eine zungenähnliche  $\beta$ -Faltblattregion, welche auch für die Öffnung der katalytischen Tasche verantwortlich ist.<sup>57</sup> bPAC zeigt eine ähnliche Anordnung wie die zuvor publizierte Struktur der OaPAC aus dem Cyanobacterium *Oscillatoria acuminata* (**Abbildung 9 B**).<sup>57,60</sup> Neben BLUF-Domänen als photosensitives Modul sind auch LOV-Domänen in PAC gefunden worden, wie zum Beispiel in der mPAC aus *Microcoleus chthonoplastes* (**Abbildung 9 B**).<sup>61</sup> Eine auf Cyanobakteriochromen basierenden PAC-Variante wurde in *Microcoleus sp.* entdeckt, welche mit Blaulicht aktiviert und mit Grünlicht inhibiert werden kann (**Abbildung 9 B**).<sup>58,59</sup> Dies wird als Vorteil gegenüber der Flavin-basierten PACs gesehen, die zur Inaktivierung thermisch zerfallen müssen.<sup>58</sup> Von Ryu *et al.* wurde eine synthetische rotlichtsensitive PAC erzeugt, in der das PCM (PCM= *photosensoric core module*) aus *Rhodobacter sphaeroides* mit der Adenylatcyclase IlaC fusioniert wurde (**Abbildung 9 B**).<sup>62</sup> Durch das stark expandierende Feld der Optogenetik und der synthetischen Biologie kommen PACs immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Mit Hilfe der PACs lassen sich cAMP-abhängige Prozesse studieren, wie z.B. die Flagellenbewegung.<sup>59</sup>

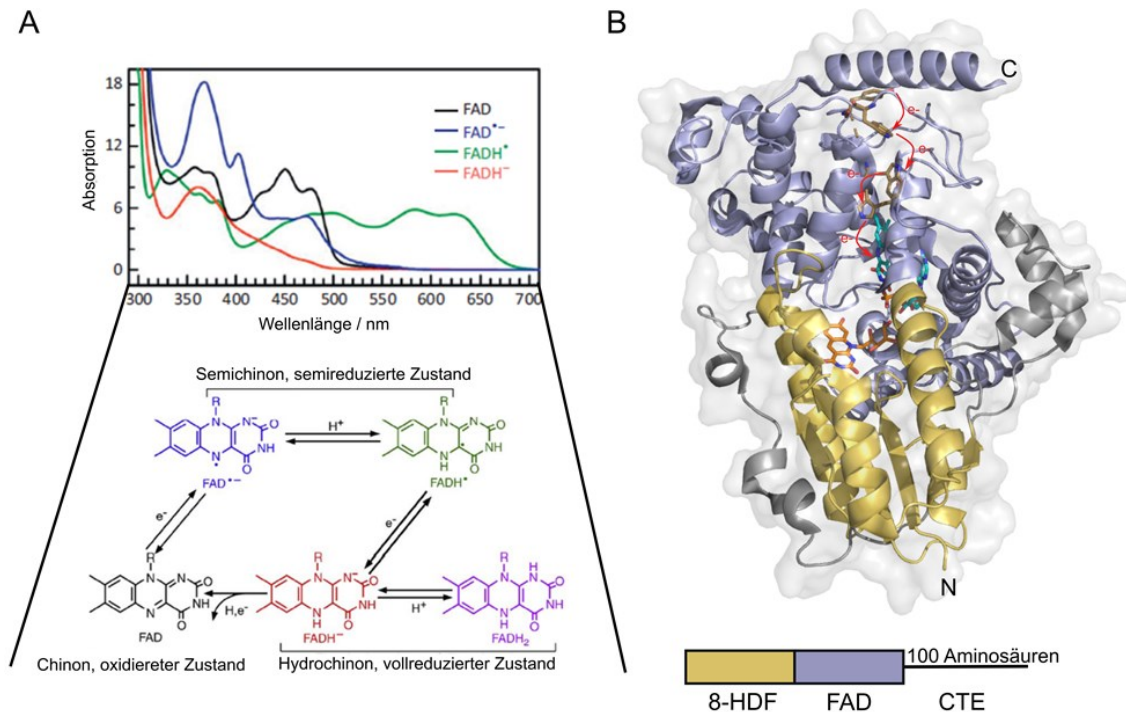
### 1.5 Cryptochrome

Cryptochrome gehören der Superfamilie der Cryptochrome und Photolyasen (CPF) an. Bei beiden handelt es sich um Flavoproteine, die ein Flavin als Cofaktor beherbergen, der an die C-terminale Domäne nicht-kovalent gebunden ist.<sup>63,64</sup> Die Familie der Cryptochrome und Photolyasen wurde nach Scheerer *et al.* in folgende Untergruppen aufgeteilt: Klasse I CPD Photolyasen, Klasse II CPD Photolyasen, Klasse III CPD Photolyasen, Pflanzencryptochrome, DASH Cryptochrome, eukaryontischen (6-4) Photolyasen und tierische Cryptochrome sowie prokaryotische (6-4) Photolyasen.<sup>64</sup> Beiden ist die blaulicht-induzierte Photoreduktion des FADs gemein. Dabei werden verschiedene Redoxzustände angenommen, wie der semireduzierte Zustand ( $\text{FAD}\cdot^-$ ,  $\text{FADH}\cdot$ ) oder der vollreduzierte Zustand ( $\text{FADH}^-$ ) (**Abbildung 10 A**).<sup>63,65</sup> Photolyasen sind im vollreduzierten Zustand in der Lage eine DNA-Reparatur durchzuführen.<sup>63,65</sup> Die zur Induktion der Reduktion benötigten Elektronen werden in den meisten Fällen über eine konservierte Tryptophantriade weiter zum FAD geleitet.<sup>63,65</sup> Neben einer Anregung mit blauem Licht wurde auch eine Anregung mit orangem und rotem Licht im semireduzierten Zustand beobachtet (**Abbildung 10 A**).<sup>63</sup> Als Antennenchromophor können verschiedene Cofaktoren in der N-terminalen Domäne gebunden sein, wie MTHF (5,10-Methenyltetrahydrofolat)<sup>66,67</sup>, 8-HDF (8-Hydroxydeazaflavin)<sup>68</sup>, FMN (Flavinmononukleotid)<sup>69</sup> oder DMRL (6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin)<sup>70</sup>. Cryptochrome und

Photolyasen besitzen eine hohe Sequenzidentität und sind strukturell eng verwandt.<sup>71</sup> Beide enthalten eine N-terminale Antennenchromophorbindedomäne, sowie eine C-terminale FAD-Bindedomäne. Die Cryptochrome besitzen zusätzlich eine C-terminale Verlängerung (CTE), diese besitzen unterschiedliche Längen und liegen ohne Interaktionspartner meist ungeordnet vor.<sup>63</sup> Cryptochrome sind zum Beispiel in die Regulierung des zirkadianen Rhythmus eingebunden und interagieren mit Interaktionspartnern, wohingegen die Photolyasen UV-Schäden in der DNA in Form von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) oder (6-4)-Photoschäden reparieren.<sup>63,71</sup>

### 1.5.1 Das animal-like Cryptochrom aus *Chlamydomonas reinhardtii* (CraCry)

Bei CraCry handelt es sich um das „animal-like Cryptochrome“ aus der Grünalge *C. reinhardtii*. Wie alle Vertreter der CPF besitzt auch CraCry ein FAD Chromophor und fungiert als (6-4) Photolyase.<sup>72,73</sup> FAD ist in der C-terminalen Domäne gebunden und 8-HDF konnte als Antennenchromophor identifiziert werden (Abbildung 10 B).<sup>72</sup>



**Abbildung 10:** Das Cryptochrome „animal-like Cryptochrome“ CraCry aus *C. reinhardtii*. **A:** Darstellung der verschiedenen Redoxzustände des FADs und der korrespondierenden Spektren Cryptochrom CraCry. (Nach Lui *et al.*<sup>65</sup>). **B:** Die Struktur von CraCry (PDB: 6FN2)<sup>72</sup> ohne C-terminale Verlängerung (CTE), die C-terminale FAD-Bindedomäne ist in blau dargestellt. Das FAD ist in cyan, katalytische Tetrade zum Elektronentransfer in braun und der Elektronenfluss durch rote Pfeile dargestellt. Die Antennenchromophorbindedomäne ist in gelb mit dem Antennenchromophor 8-HDF in orange dargestellt. Eine schematische Darstellung verdeutlicht die Position der 100 Aminosäuren langen C-terminalen Verlängerung (CTE) in der Domänenanordnung.



## 1 Einleitung

Liegt das FAD im semireduzierten Zustand vor, ist auch eine Anregung mit rotem bzw. orangem Licht möglich.<sup>74</sup> Von *Beel et al.* wird CraCry als ein Blau- und Rotlicht aktivierbares Flavoprotein beschrieben, da sowohl Rot- und Blaulicht eine ähnliche CraCry-vermittelte Veränderung in der Genexpression in *C. reinhardtii* zeigen.<sup>74</sup> Von *Oldenmeyer et al.* sowie *Nohr et al.* konnte gezeigt werden, dass ein Tyrosinrest (Y373) in die Elektronenweiterleitung involviert ist und so in CraCry eine katalytische Tetrade vorliegt (**Abbildung 10 B**).<sup>75,76</sup> Weitere Studien zeigten eine (6-4) Photolyaseaktivität von CraCry, da über die C-terminale Helix (**Abbildung 10 B**) DNA gebunden wurde.<sup>72</sup> Folgend konnte die Reparatur von DNA *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden.<sup>72</sup> Die strukturelle Lage der 100 Aminosäuren langen CTE änderte sich mit dem Oxidationszustand, was mit Hilfe des Hydrogen-Deuterium-Austausch nachgewiesen wurde.<sup>73</sup> Diese Änderung wird wahrscheinlich durch die Bildung des stabilen Tyrosinradikals Y373 induziert.<sup>73</sup> Dadurch konnten Rückschlüsse auf das *in vivo* Verhalten gezogen werden und es wurde zunächst postuliert, dass die C-terminale Verlängerung sich am Tag entfalten könnte und sich so der Interaktionspartner von CraCry löst, während er im Dunkeln/Nacht gebunden ist.<sup>73</sup> Dieses Postulat geht mit *in vivo* Experimenten zur Fortpflanzung von *C. reinhardtii* einher, in denen CraCry im Dunkeln mit pCry interagiert.<sup>77</sup>

### 1.6 *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Der Organismus *Saccharomyces cerevisiae* wird von der Menschheit seit mehreren tausend Jahren genutzt und ist als Bäckerhefe bekannt. *S. cerevisiae* wird zum Brauen von Bier, in der Weinherstellung, zum Backen und in der Biotechnologie zum Herstellen von wertvollen Sekundärmetaboliten verwendet.<sup>78,79</sup> Bei diesem einzelligen Organismus handelt es sich um einen Pilz<sup>78</sup>, mit einem Durchmesser einer nicht knospenden Zelle von ~5 µm.<sup>78</sup> Das Genom von *S. cerevisiae* wurde 1996 vollständig sequenziert.<sup>78</sup> In den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden die ersten Studien mit der Bäckerhefe auf genetischer Ebene durchgeführt<sup>79</sup>, sodass in den fünfziger Jahren der meist genutzte Laborstamm S288C geschaffen wurde.<sup>78,79</sup> Im Jahr 1978 verlief die erste Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA erfolgreich.<sup>78,80</sup> Anschließend begab sich der Organismus auf dem Weg zum Modellorganismus. Unter idealen Laborbedingungen teilt sich *S. cerevisiae* alle 90 Minuten.<sup>78</sup> *S. cerevisiae* besitzt zwei Paarungstypen, a und α, welche bei der Paarung eine diploide Zelle bilden.<sup>78</sup> Mit der Einführung der Bäckerhefe Genom-Datenbank ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)), ist ein Zugriff auf sämtliche Informationen bezüglich des Genoms und der Hefestämme möglich. In NCBI PubMed finden sich 127929 Publikationseinträge zu *S. cerevisiae* wieder (Stand 28.08.2019). Das sind etwa ein Drittel der Einträge, die zu *E. coli* zu finden sind. Die



## 1 Einleitung

Anwendungen mit *S. cerevisiae* in Forschung und Biotechnologie sind sehr vielseitig. Zur Untersuchung von Proteininteraktionen *in vivo* wurde das „Yeast two-hybrid“-System entwickelt.<sup>78,81</sup> Von industrieller und biotechnologischer Seite besteht ein Interesse daran Basischemikalien herzustellen, ohne auf die Erdölvorräte zurückzugreifen.<sup>82</sup> Daher, dass *S. cerevisiae* sehr gut kultivierbar ist, bietet der Organismus einige Vorteile für die Industrie. Erstens handelt es sich nach gentechnischen Richtlinien um einen sichereren Organismus, zweitens besitzt sie eine gute pH-Toleranz im Vergleich zu Bakterien und drittens eine Toleranz gegenüber Fermentationsinhibitoren.<sup>82</sup> Somit werden Basischemikalien, wie zum Beispiel Isobutanol, Etylen, Milchsäure, Succinsäure, Resveratrol und Farnesene biotechnologisch in *S. cerevisiae* hergestellt.<sup>82</sup> Ausgehend von der Bier- und Weinproduktion hat *S. cerevisiae* immer mehr an Bedeutung für die Menschheit gewonnen, welche in den nächsten Jahren wahrscheinlich noch zunehmen wird.

## 2 Zielsetzungen der Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung neuer blaulicht-abhängiger Module basierend auf Flavoproteinen. In vorangegangener Masterarbeit wurde ein neuartiges Schaltverhalten von Mutanten der AuLOV-Domäne im psd-Modul in *S. cerevisiae* gefunden. Während der Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Schaltverhalten wahrscheinlich abhängig von den Dimerisierungsverhalten der AuLOV-Mutanten ist.<sup>83</sup>

Erstens soll die Charakterisierung der Mutanten der AuLOV-Domäne<sup>83</sup> abgeschlossen werden, sowie die Dimeranordnung strukturell und bioinformatisch untersucht werden. Mittels spektroskopischer und proteinbiochemischer Methoden soll die weitere Charakterisierung der Mutanten erfolgen.

Zweitens soll basierend auf den vorangegangenen *in vivo* Experimenten der Masterarbeit<sup>83</sup> und der *in vitro* Charakterisierung der AuLOV-Mutanten, eine optogenetische Applikation in *S. cerevisiae* mithilfe des photosensitiven Degron entwickelt werden. Ziel dieser Anwendung ist es in Abhängigkeit von Blaulicht zelluläre Prozesse in *S. cerevisiae* zu steuern. Weiterhin soll ein lösliches *in vivo* Konstrukt aus den Arbeiten in *S. cerevisiae* mittels proteinchemischer Methoden untersucht werden.

Abschließend soll überprüft werden, ob mit dem Cryptochrom CraCry aus *C. reinhardtii* im photosensitiven Degronmodul ein ähnliches *in vivo* Verhalten wie mit einer LOV-Domäne erzielt werden kann. Grundlage dafür bilden die neusten strukturellen und spektroskopischen Kenntnisse über CraCry aus dem ESSEN-Labor. Ziel ist es, grundlegende Erkenntnisse für die Entwicklung eines neuartigen rotlichtabhängigen Degrons zu erlangen.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte

ÄKTA Purifier System Box 900, frac950, pH/C-900, UV-900, P-900, INV-907, PV-908, M-925	<i>AmershamBioscience</i>
Agarosegel Box, Selbstherstellung	<i>Feinmechanik FB Chemie, Philipps-Universität Marburg</i>
Agarosegeldokumentation, Transilluminator DP-CF-011.C	<i>Vilber Lourmat</i>
Autoklav VX150	<i>Systec</i>
Chromatographiesäulen: Ni-NTA-Säule (1 ml und 5 ml) HisTrap HP	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>
SEC-Säulen: Superdex 75 10/30, Superdex 200 16/60, Superdex 200 26/60	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>
Inkubator Incu-LINE	<i>VWR</i>
Elektroporationssystem: <i>Pules controller</i> , <i>Gene pulser</i> und <i>Capacitance Extender</i>	<i>BioRad</i>
Fluorimeter Synergy MX	<i>BioTek</i>
French-Press Druckzelle	<i>American Instrument Company</i>
Gelelektrophorespowerbox Enduro Powersupplies	<i>Labnet international Inc.</i>
Gelschüttler 3013	<i>GFL</i>
Heizblock BT3	<i>Grant Instruments</i>
Küvette (UV/VIS) Absorptionszelle 105.200-QS	<i>Hellma</i>

### 3 Material

LED-Lampe 455 nm Lumileds L XK2-PR14Q00	<i>Luxeon</i>
LED-Lampe 455 nm ILH-OW01-DEBL-SC211	<i>Intelligent LED Solutions</i>
NanoDrop-Spektrometer ND-1000	<i>NanoDrop</i>
Peristaltikpumpe Pharmacia LKB-Pumpe P1	<i>Pharmacia</i>
Pipetten Research plus	<i>Eppendorf</i>
pH-Meter pH 7110	<i>Ino Lab</i>
Photometer Genesys 10 UV-Scanning	<i>Thermo spectronic</i>
OD600 Photometer, DiluPhotometer; Ultraspec 10	<i>Implen; Amersham Bioscience</i>
Reaktionsgefäßschüttler VXR basic Vibrax	<i>IKA</i>
SDS-PAGE Apparatur Mini PROTEAN Tetra Cell	<i>BioRad</i>
Schüttelinkubatoren: Multitron eco EB swip TH25, SM-30	<i>HT Infors</i> <i>Edmund Böhler</i>
<i>Thermocycler</i> Tpersonal	<i>Biometra</i>
Thermomixer Comfort	<i>Eppendorf</i>
Vortexschüttler: MS1 Minishaker Vortex Genie 2	<i>IKA</i> <i>Scientific Industries</i>
Waagen: PC2000 und LabStyle54 S2002 und S2003	<i>Mettler Toledo</i> <i>Denver Instrument</i>

### 3 Material

Wasserbad Y14	<i>Grand</i>
Westernblot-Detektionsstation <i>Chemocamimager</i>	<i>Intas</i>
Zentrifugen: J2-21, Heraeus Fresco 17, Heraeus Pico 17, 5804R	<i>Beckmann, Thermo Scientific, Eppendorf</i>

#### 3.2 Chemikalien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	<i>Roth</i>
Agar-Agar	<i>Roth</i>
Agarose rein	<i>Invitrogen</i>
Ammoniumsulfat	<i>Sigma Aldrich, AppliChem</i>
Ampicillin	<i>Roth</i>
APS	<i>Fluka</i>
Bacto Trypton	<i>BD</i>
Bacto Pepton	<i>BD</i>
Bacto Hefeextrakt	<i>BD</i>
Borsäure	<i>Grüssing</i>
$\beta$ -Mercaptoethanol	<i>AppliChem</i>
Bradfordreagenz (5x)	<i>BioRad</i>
Calciumchlorid	<i>Merck</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Sigma Aldrich</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>New England Biolabs</i>

### 3 Material

Dodecylsulfat Natriumsalz	<i>Serva</i>
DNAaseI	<i>AppliChem</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Merck</i>
Essigsäure	<i>VWR Chemicals</i>
Ethanol	<i>VWR Chemicals</i>
Gelpilot Ladefarbstoff (5x)	<i>Qiagan</i>
Glycerin	<i>Roth</i>
Glukose	<i>Roth</i>
Imidazol	<i>Merck</i>
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	<i>Gerbu</i>
Isopropanol	<i>VWR Chemicals</i>
Kanamycin	<i>AppliChem</i>
Lithiumacetat	<i>Acros</i>
Lysozym	<i>Serva</i>
Milchpulver	<i>Roth</i>
Mass Ruler DNA Ladder Mix (SM0403)	<i>Thermo Scientific</i>
Natriumazid	<i>Roth</i>
Natriumchlorid	<i>AppliChem</i>
Natriumdihydrogenphosphat	<i>Merck</i>
Natriumhydroxid	<i>AppliChem</i>

### 3 Material

PEG 3350	<i>Fuka</i>
Ponceau S	<i>Roth</i>
Proteaseinhibitor-Cocktail	<i>Sigma Aldrich</i>
Unstained Protein Molecular Weight Marker	<i>Thermo Scientific</i>
Rotiphenol zur DNA-Isolation (TE-Puffer äquilibriert, Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol 25:24:1, pH 7.5-8.0)	<i>Roth</i>
Sorbitol	<i>Sigma</i>
TEMED	<i>Roth</i>
Tris	<i>Roth</i>
Tween 20	<i>Roth</i>
<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	<i>Thermo Scientific</i>
Virkon	<i>DuPont</i>
<i>Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und mit Ammoniumsulfat</i>	<i>Invitrogen</i>

#### 3.3 Verbrauchsmaterial

Dialysemembran Slid A-Lyzer-Mini Dialysis Units	<i>Thermo Scientific</i>
Falcongefäße	<i>Greiner Bio-One, Sarstedt</i>
Konzentratoren MWCO 10000 / 30000	<i>Millipore</i>
Küvetten (Polystyrol)	<i>Sarstedt</i>
Mikrotiterplatte 96 Vertiefungen, Flachboden schwarz	<i>Greiner Bio-On</i>
Mikrotiterplatte 96 Vertiefungen, Rundboden transparent	<i>Thermo Scientific</i>

### 3 Material

PCR-Gefäße	<i>Sorenson BioScience, Inc.</i>
Pipetten	<i>Sarstedt</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt</i>
Reagiergefäße (2.0 ml und 1.5 ml)	<i>Eppendorf und Sarstedt</i>
Spritzen und Kanülen	<i>B. Braun</i>
Spritzenvorsatzfilter Ø: 0.45/0.2 µm	<i>Sarstedt</i>
TC-Flaschen Ventilverschluss	<i>Sarstedt</i>
Vakuumfiltrationseinheit PES Ø: 0.45/0.2 µm	<i>VWR</i>

#### 3.4 Vorgefertigte Sets

SEC Kalibrationsset	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>
QIAquick PCR-Aufreinigungsset	<i>Qiagen</i>
QIAquick Spin-Mini-Präparationsset	<i>Qiagen</i>

#### 3.5 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von *New England Biolabs* oder *Thermo Scientific* bezogen und gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet.

#### 3.6 Puffer und Lösungen

Alkalischer Lyse-Puffer	7,5 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 92,5 % 2 M NaOH
Blotting-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % (v/v) Methanol
Cut Smart Puffer (10x)	<i>New England Biolabs</i>



### 3 Material

Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Blue R-250, 5 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Ethanol
EB-Puffer	<i>Qiagen</i>
Entfärbelösung	5 % (v/v) Essigsäure, 28 % (v/v) Isopropanol
HF-Phusion-Puffer	<i>New England Biolabs</i>
HU-Puffer	8 M Urea, 55 (w/v) SDS, 200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.8, 0,1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 15 mg/ml DTT
Ni-NTA-Puffer A	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 100 mM NaCl, 20 % Glycerin, pH 7,8
Ni-NTA-Puffer B	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 100 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 20 % Glycerin, pH 7,8
PEG-Puffer	100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 40 % PEG 3350, pH 8 (Eingestellt mit Essigsäure)
Ponceau-S-Puffer	1 % (w/v) Ponceau S, 1 % (v/v) Essigsäure
Sammelgelpuffer	0,625 M Tris-HCl, pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris, 2 M Glycine, 1 % (w/v) SDS
SORB-Puffer	100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M Sorbitol, pH 8 (Eingestellt mit Essigsäure)
Stripping-Puffer (Westerblot)	2 % (w/v) SDS, 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 M $\beta$ -Mercaptoethanol
Tangopuffer	<i>Thermo Scientific</i>

### 3 Material

TBE-Puffer (10x)	1 M Tris, 1 M Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8,4
TBST-Puffer	20 mM Tris pH 7,6, 136 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20
TEA-Puffer (10x)	0,4 M Tris, 0,2 M Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,5
TFB-I-Puffer	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 30 mM KOAc, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % (v/v) Glycerin
TFB-II-Puffer	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % (v/v) Glycerin)
Trenngelpuffer	1,125 M Tris-HCl, 30 % (w/v) Saccharose, pH 8,8
Tris-Puffer	10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,0

#### 3.7 Medien und Selektionsplatten

Aminosäuremix	20 g aller kanonischen Aminosäuren +/- Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin (je nach Mix), 2 g <i>p</i> -Aminobenzoat, 5 g Adenin
LB-Medium	1,0 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) NaCl, 0,4 % 10 M NaOH (autoklaviert)
LB-Agar	LB-Medium, 1,5 % (w/v) Agar-Agar (autoklaviert)
LFM-Medium	10 % (v/v) 10x Salzlösung, 0,01 % (v/v) Spurenelementlösung, 0,01 % (v/v) Vitaminlösung, 2 % (w/v) Glukose, 0,2 % Aminosäuremix (sterilfiltriert)

### 3 Material

YPD Medium	2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glukose, 1 % (w/v) Hefeextrakt (autoklaviert)
YPD-Agar	YPD-Medium, 1,5 % (w/v) Agar-Agar (autoklaviert)
5FOA-Platten -LEU	0,67 % Yeast Nitrogen Base, 0,2 % SC -Ura -LEU Aminosäuremix, 2 % Glukose, 50 µg/mL Uracil, 0,1 % 5-FOA, vermischt mit 2 % Agar (autoklaviert) und anschließend steril filtriert
SC- Platten	0,2 % Yeast Nitrogen Base, 0,2 % SC -Ura -LEU Aminosäuremix, 2 % Glukose, 0,5 % Ammoniumsulfat (autoklaviert); vermischt mit 2 % Agar (autoklaviert)
Salzlösung (10x)	10 % $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 % (w/v) $\text{MgSO}_4$ , 1 % (w/v) $\text{NaCl}$ , 1 % $\text{CaCl}_2$ , 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Spurenelementlösung	0,05 % (w/v) $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 0,004 % (w/v) $\text{CuSO}_4$ , 0,01 % (w/v) $\text{KI}$ , 0,03 % (w/v) $\text{FeCl}_3$ , 0,04 % (w/v) $\text{MnSO}_4$ , 0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0,04 % (w/v) $\text{ZnSO}_4$
Vitaminlösung	0,0002 % (w/v) Biotin, 0,04 % (w/v) Calcium Pantothenat, 0,2 % (w/v) Inositol, 0,04 % (w/v) Niacin, 0,02 % (w/v) <i>p</i> -amino Benzoat, 0,04 % (w/v) Pyridoxin HCl , 0,04 % (w/v) Thiamin HCl

### 3 Material

### 3.8 Antikörper

Ziege gegen Maus, IgG, mit Peroxidase markiert, sc-2054

*Santa Cruz Biotechnology*

Ziege gegen Hase, IgG, mit Peroxidase markiert

*Jackson Immuno Research/Dianova*

Maus gegen GFP, monoklonal, sc-9996

*Santa Cruz Biotechnology*

Hase gegen mCherry, polyklonal, 5993-100

*BioVision*

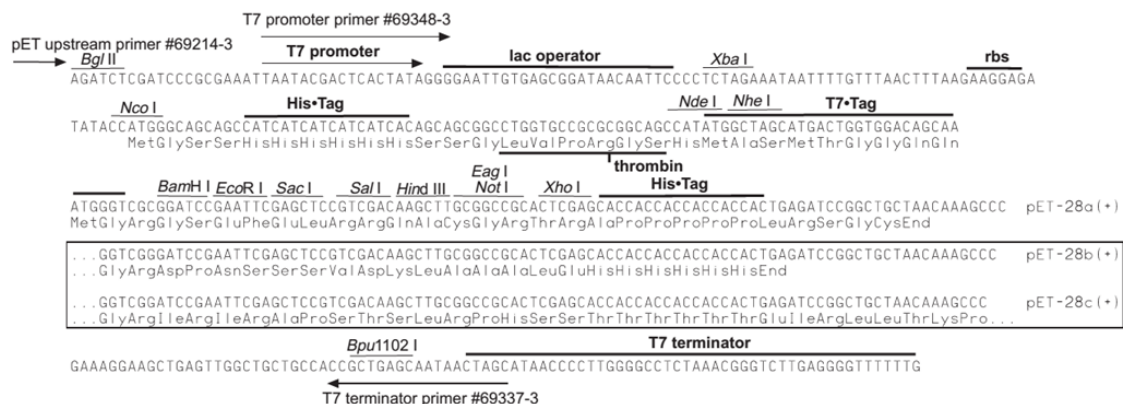
Hase gegen  $\alpha$  Tubulin [EPR13799], monoklonal, ab184970

Abcam

### 3.9 Plasmide

### 3.9.1 pET28a(+) Vektor basierte Expressionsplasmide

Plasmide für die Überproduktion von Proteinen in *E.coli* basieren auf dem pET28a(+) Vektor von Novagen (Darmstadt, Deutschland). Der pET28a(+) Vektor enthält eine Kanamycinresistenz, sowie einen *fl ori* und eine *multiple cloning site*. Flussaufwärts der *Multiple cloning site* befindet sich das *lac operon*. Dadurch kann die Expression der darauffolgenden DNA-Sequenz mit Proteinüberproduktion mit Hilfe von IPTG induzieren werden.<sup>84</sup> Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, das Protein N- bzw. C-terminal mit einem Histidin-Tag zu versehen, die N-terminale Variante erlaubt es den Histidin-Tag später durch einen Thrombinverdau zu entfernen (**Abbildung 11**).<sup>85</sup> Tabelle 3 enthält die Plasmide die für die Proteinüberproduktion verwendet wurde.



**Abbildung 11:** *Multiple cloning site* und die regulatorischen Elemente des pET28a(+) Vektors, der zur Überproduktion von Proteinen verwendet wurde.<sup>85</sup>

### 3 Material

**Tabelle 3:** Plasmide basierend auf den pET28a(+)-Vektor zur Proteinüberproduktion.

Plasmid	Konstrukt	Herkunft
LOVJa	AuLOV	Ankan Banerjee
SH7.1	AuLOV <sup>W349</sup>	Masterarbeit Hepp
SH9.2	AuLOV <sup>M254</sup>	Masterarbeit Hepp
SH10.5	AuLOV <sup>M254 W349</sup>	Diese Arbeit
VIS1.21	mCherry-3myc-AuLOV-cODC1	Diese Arbeit

#### 3.9.2 Plasmide für *in vivo* Studien in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Plasmide, die für *in vivo* Studien in *S. cerevisiae* verwendet wurden, basieren auf den Plasmiden pRS315 und pRS316.<sup>86</sup> Sie tragen eine Ampicillinresistenz und als Auxotrophiemarker –*LEU2*-Gen (pRS315) oder –*URA3*-Gen (pRS316).<sup>86</sup> Die Plasmide wurden durch *in vivo* Ligation in der Bäckerhefe oder durch eine Mutagenese-PCR erzeugt. In der Tabelle 4 sind die Plasmide gelistet.

**Tabelle 4:** Plasmide für die *in vivo* Studien in *S. cerevisiae*.

Plasmid	Konstrukt	Herkunft
pRS315	LEU2 ARS209/CEN2	
pRS316	URA3 ARS209/CEN2	
pDS167	pRS315 P <sub>ADHI</sub> -tagRFP-AuLOV-cODC1	Taxis
pDS178	pRS315 P <sub>ADHI</sub> -tagRFP-AuLOV-cODC1 <sup>CA</sup>	Taxis
pDS181	pRS316 P <sub>ADHI</sub> -tagRFP-bPAC	Taxis
pDS185	pRS315 P <sub>ADHI</sub> -sfGFP-P2A-mCherry-3myc-AtLOV2-cODC1	Taxis
pSeb1	pRS315 P <sub>ADHI</sub> -sfGFP-P2A-mCherry-3myc-AuLOV-cODC1	Masterarbeit S.Hepp <sup>83</sup>
pSeb2	pRS315 P <sub>ADHI</sub> -sfGFP-P2A-mCherry-3myc-AuLOV <sup>V349W</sup> -cODC1	Masterarbeit S.Hepp <sup>83</sup>
pSeb4	pRS315 P <sub>ADHI</sub> -sfGFP-P2A-mCherry-3myc-AuLOV <sup>V254M</sup> -cODC1	Masterarbeit S.Hepp <sup>83</sup>

### 3 Material

pSeb7	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP-P2A-mCherry-3myc-AuLOV <sup>V349W</sup> - cODC1 <sup>CA</sup>	Masterarbeit S.Hepp <sup>83</sup>
pSeb8	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP-P2A-mCherry-3myc-AuLOV <sup>V254M</sup> - cODC1 <sup>CA</sup>	Masterarbeit S.Hepp <sup>83</sup>
pSeb11	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP-P2A-mCherry-3myc-AuLOV <sup>V254M/V349W</sup> - cODC1	Diese Arbeit
pSeb12	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP-P2A-mCherry-3myc-AuLOV <sup>V254M/V349W</sup> - cODC1 <sup>CA</sup>	Diese Arbeit
pSeb19	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -tagRFP-bPAC-AuLOV <sup>V254M/V349W</sup> -cODC1 <sup>CA</sup>	Diese Arbeit
pSeb23	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -bPAC-AuLOV <sup>V254M/V349W</sup> -cODC1 <sup>CA</sup>	Diese Arbeit
pSH12	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP-P2A-mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 <sup>CA</sup>	Masterarbeit S. Hasenjäger <sup>87</sup>
pCraCryV1	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP_P2A_mCherry_3myc_CraCryV1-cODC1	Diese Arbeit
pCraCryV2	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP_P2A_mCherry_3myc_CraCryV2-cODC1	Diese Arbeit
pCraCryV3	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP_P2A_mCherry_3myc_CraCryV3-cODC1	Diese Arbeit
pCraCryV4	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP_P2A_mCherry_3myc_CraCryV4-cODC1	Diese Arbeit
pCraCryV5	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP_P2A_mCherry_3myc_CraCryV5-cODC1	Diese Arbeit
pCraCryV6	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP_P2A_mCherry_3myc_CraCryV6-cODC1	Diese Arbeit
pCraCryV7	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP_P2A_mCherry_3myc_CraCryV7	Diese Arbeit
pCraCryV8	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP_P2A_mCherry_3myc_CraCryV8-cODC1	Diese Arbeit
pCraCryV9	pRS315 P <sub>ADH1</sub> -sfGFP_P2A_mCherry_3myc_CraCryV3- cODC1 <sup>CA</sup>	Diese Arbeit
pDS312	pRS316 P <sub>Cyc1</sub> -tagRFP-bPAC	Taxis
pCM80	pFA6a-3mCherry::natNT2	Taxis

---

### 3.10 Primer

Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle 5 aufgeführt. Die Stammkonzentration der Primer beträgt 100  $\mu\text{M}$ , die Arbeitskonzentration ist 10  $\mu\text{M}$ . Selbstentworfenen Primer wurden bei *Metabion* bestellt. Ein Teil der Primer wurde aus Primersammlung des *Taxis* Labors entnommen.

**Tabelle 5:** Liste der verwendeten Primer. Fwd zeigt an, dass es sich um einen Vorwärtsprimer und Rev um eine Rückwärtsprimer handelt. Sq zeigt an das er zur Sequenzierung dient. Die Mutationsprimer enthalten die Information für welche Mutation sie dienen, des Weiteren sind enthaltene Schnittstellen für den Restriktionsverdau bzw. das Zielploid vermerkt. Ein T zeigt an, dass diese aus den *Taxis* Labor stammen.

Primer	Sequenz
Fwd_ AuLOV _V349W	AACTTCGTGGGTTGGCAGTGCAAAG
Rev_ AuLOV _V349W	CCGATACTTTGCACTGCCAACCCACGAAG
Fwd_ AuLOV _V254M	CAAACTTCGTCATGACCGAT
Rev_ AuLOV _V254M	ATCGGTCATGACGAAGTTTTG
Fwd_ AuLOV; NdeI	CGGCAGCC <u>CATAT</u> TGGACTTTAGCTTTATCAAAGC
Rev_ tagRFP_ bPAC_ AuLOV	CTGAGCGGTCTGCAGGGCTTTGATAAAGCTAAAGTCCATTTTATCTTTT CCAGGGTCTG
Rev_ tagRFP_ bPAC_ myc	CAAATCTTCTTCAGAAATCAACTTTTGTTACCTCTAGATTTATCGTTTT CCAGGGTCTG
Rev_ tagRFP_ bPAC für pDS237	TACTTTAACGTCAAGGAGAAAAACGGATCCCCCGGAATGTCTGAA TTAATTAAAGAAAATATGC
Fwd_ cODC1a für pDS237	TAGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATGCGCCGGAATTCCTTATTGGAA GTACAAGTTTTTCAG
Fwd_ tagRFP_ bPAC pDS237	TAGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATGCGCCGGAATTCCTTATTTATCG TTTTCCAGGGTC
Fwd_ bPAC; NdeI	CGGCAGCC <u>CATAT</u> TGATGAAACGCCTGGTGTATAT
Rev_ bPAC; EcoRI	TGCGCCGGAATTCCTTATTTATCGTTTTCCAGGGTCTG

### 3 Material

Rev_bPAC_sq	CAGGTTAATGGTTTTTCATGGC
Fwd_3myc-CraCry	ATTAATCTCAGAAGAAGACTTGAACGGATCATCTAGAGTCATGGCAGG CGTTAAAAATTCC
Rev_CraCryV1	GTACAAAGAAGTAATAGATTCTTGTGCACAAGACATTGCTGCTGCCAT ACGTGC
Rev_CraCryV2	GTACAAAGAAGTAATAGATTCTTGTGCACAAGACATTGCTAGTGCCAT ACGTGCAATACATGC
Rev_CraCryV3	AGAAGTAATAGATTCTTGTGCACAAGACATAGGAAGTGCTGCTGCCAT ACGTG
Rev_CraCryV4	AGAAGTAATAGATTCTTGTGCACAAGACATAGGAAGTTTGCTACGACG ATATGCTGC
Rev_CraCryV5	GTACAAAGAAGTAATAGATTCTTGTGCACAAGACATTTTGCTACGACG ATATGCTGC
Rev_CraCryV6	GTACAAAGAAGTAATAGATTCTTGTGCACAAGACATACGTGCAATACA TGCTTTGCTTG
Rev_CraCryV7	GTAAGCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGTTATTTGCTACGACG ATATGCTGC
Rev_CraCryV8	GTACAAAGAAGTAATAGATTCTTGTGCACAAGACATATATGCTGCTGC CATACGTG
Fwd_CraCry_sq	GATCCGAGCGCATGGGAA
Rev_CraCry_sq	GTTCTTCAAACACTTCCATACC
rec2-seq_sq T	GCGTGACATAACTAATTACATG
DON1_up_sq T	GCTATACCAAGCATACAATCAAC
cODCAurLOVdowre T	ACAAAGAAGTAATAGATTCTTGTGCACAAGACATTGGCAAATCCTCAT CATCATTCGCTGCG
Tcycl_end_rev_sq T	ATTAAAGCCTTCGAGCGTCC



### 3 Material

mCherry_r T	CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGCCGGTGGAG
Myc_aurLOV T	ATTAATCTCAGAAGAAGACTTGAACGGATCATCTAGAGTCATGGACTT TAGCTTTATCAAAGC
tagRFP_PstI T	GTTATATCCAGCTGCAGATGGTGGTTTAGAAGG
myc_lov_up_rev T	ATGACTCTAGATGATCCGTTC
msn2_s2 T	AACAGAATTATCTTATGAAGAAAGATCTATCGAATTAAAAAAATGGGG TCTATTAATCGATGAATTCGAGCTCG
msn2_s3 T	TAGAAGCGATAATTTGTCGCAACACATCAAGACTCATAAAAAACATGG AGACATTCGTACGCTGCAGGTCGAC

## 3.11 Stämme

### 3.11.1 Bakterielle Stämme

Bei den bakteriellen Stämmen handelt es sich um kommerziell verfügbare Derivate von *Escherichia coli*. Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sind in der Tabelle 6 gelistet.

**Tabelle 6:** *E. coli* Stämme die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Stamm	Genotyp	Verwendung	Firma
BL21-DE-Gold	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Proteinüberproduktion	Novagen
DH5α	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1</i> <i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 λ<sup>-</sup> thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	Plasmidvermehrung	Invitrogen
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK</i> <i>λ<sup>-</sup> rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Plasmidvermehrung	Invitrogen

### 3.11.2 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Die Stämme sind entweder Derivate des S288C Stammes ESM356-1, des SK-1 Stammes YCR75, der Stämme YCR76, WCG4a (WCG4a, WCG4a-11/22, YHi29/14) oder DF5 (JD47 und JD77). In Tabelle 7 sind die Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden aufgelistet.

### 3 Material

**Tabelle 7:** Die in dieser Arbeit verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme und ihre Wachstumsbedingung.

Stamm	Genotyp	Wachstumsbedingung	Herkunft
ESM356-1	MATa ura3-53 leu2-Δ1 his3-Δ200 trp1-Δ63	30 °C	Pereira et al. <sup>88</sup>
WCG4a	MATa ura3 leu2-3,112 his3-11,15 Can <sup>S</sup> Gal <sup>+</sup>	RT	Heinemeyer et al. <sup>89</sup>
WCG11/22	WCG4a pre1-1 pre2-2	RT	Gerlinger et al. <sup>90</sup>
YHI29/14	WCG4a pre1-1 pre4-1	RT	Heinemeyer et al. <sup>89</sup>
JD47-13C	MATa his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-Δ63 ura3-52	RT	Ramos et al. <sup>91</sup>
JD77-1-1	JD47-13C <i>uba1Δ::HIS3</i> pRSts64 ( <i>uba1-ts64 TRP1</i> )	RT / Temperatursensitiv 37 °C	Palanimurugan et al. <sup>92</sup>
YCR75	MATα his3 leu2 trp1 Δ FA ura3, ho::LYS2	30 °C	Taxis
YCR76	MATa his3 leu2 trp1 deltaFA ura3, ho::LYS2	30 °C	Taxis
YDS465	YCR76 <i>MSN2-3mCherry::natNT2</i>	30 °C	Taxis
YJT14	YCR75 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , pDS181	0,5 μmol*s <sup>-1</sup> *m <sup>-2</sup> Blaulicht	J. Trauth <sup>93</sup>
YSeb5/6	YCR75 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , pSeb19	5 μmol*s <sup>-1</sup> *m <sup>-2</sup> Blaulicht	Diese Arbeit
YSeb12	YCR75 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , pSeb23	5 μmol*s <sup>-1</sup> *m <sup>-2</sup> Blaulicht	Diese Arbeit
YSeb18	YCR75 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , <i>MSN2-3mCherry::natNT2</i> , pSeb23	5 μmol*s <sup>-1</sup> *m <sup>-2</sup> Blaulicht	Diese Arbeit
YSeb38	YCR75 <i>cyr1Δ::hphNT1</i> , <i>MSN2-3mCherry::natNT2</i> , pDS312	0,5 μmol*s <sup>-1</sup> *m <sup>-2</sup> Blaulicht	Diese Arbeit

## 4 Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden Standardprotokollen entnommen und wenn nötig wie beschrieben angepasst. Die Molekularbiologische Methoden wurden den Standardprotokollen von *Ausubel*<sup>94</sup> entnommen. Für das Arbeiten in *S. cerevisiae* wurden noch die Arbeiten von und *Sherman*<sup>95</sup>, *Sikorski* und *Boeke*<sup>96</sup>, *Lutz* und *Taxis*<sup>97</sup> und *Janke et al.*<sup>98</sup> herangezogen. Die Proteinbiochemischen Methoden wurde von *Banerjee et al.*<sup>33,36</sup> entnommen.

### 4.1. Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen oder zum Einbringen von Mutationen in die DNA-Sequenz benutzt. In Tabelle 8 sind die Zusammensetzungen der PCR-Reaktionsgemische aufgelistet und in Tabelle 9 das entsprechende Standardprogramm für den *Thermocycler*. Der Puffer wurde je nach GC-Gehalt der DNA variiert. Für GC-reiche Konstrukte wurde der GC-Puffer von *New England Biolabs* verwendet, für alle anderen Konstrukte der HF Phusion-Puffer von *NEB*. Bei zu geringer Ausbeute, wurde in Schritt 3 (**Tabelle 9**), die Temperatur verändert, um höhere Ausbeuten zu erzielen. Um das Hefegenom zu verändern, wurde der PCR Ansatz aus Tabelle 10 und das Programm aus Tabelle 11 zum Erzeugen der DNA-Fragmente verwendet. Die PCR wurde entweder durch das QIAquick PCR-Aufreinigungsset von *Qiagen* gereinigt oder es wurde eine DNA-Fällung in 100 % Ethanol bei -20 °C durchgeführt. Die Reinheit wurde mit einem Agarosegel überprüft. Für die Transformation von Hefezelle wurde das PCR Produkt direkt verwendet.

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die PCR.

	Mutagenese-PCR / µl	Amplifikation / µl
Plasmid DNA (60 -150µg/µl)	1	1
Primer 1 (10 mM)	2.5	5
Primer 2 (10 mM)	2.5	5
DMSO	1	3
Phusion-Polymerase	1	2
Puffer	10	20
dNTPs	1	2
dH <sub>2</sub> O	32	63

## 4 Methoden

**Tabelle 9:** Standardprogramme für die PCR.

Schritt	Mutagenese-PCR / $\mu\text{l}$	Amplifikation / $\mu\text{l}$
1	Primer Denaturierung	30 s $\rightarrow$ 98 °C
2	Denaturierung	30 s $\rightarrow$ 98 °C
3	Anlagerung	45 s $\rightarrow$ 55 °C
4	Elongation	~15 s/kb $\rightarrow$ 72 °C
	20 mal zurück zu 2	24 mal zurück zu 2
5	Extension	-
6	Pause	4 °C

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des Reaktionsmix für die PCR zur Genomveränderung von *S. cerevisiae*. \*Selbst hergestellt Polymerase der AG Mösch.

	Menge / $\mu\text{l}$
10x Phusion SM buffer	10
dNTP	3,5
Primer 1 (10 mM)	6,5
Primer 2 (10 mM)	6,5
Matrizen DNA	1
Betain (5 M)	20
dH <sub>2</sub> O	50,5
Taq-Polymerase*	2

**Tabelle 11:** Parameter für den *Thermocycler* bei PCR zur Genomveränderung von *S. cerevisiae*.

Schritt	
1	Primer Denaturierung
2	Pause für die Zugabe der Polymerase
3	Denaturierung
4	Denaturierung
5	Anlagerung
6	Elongation
	20 mal zurück zu 4
7	Denaturierung
8	Anlagerung
9	Elongation
10	20-mal zurück zu 7
11	Pause

### 4.1.2 DNA-Fällung

Zur Konzentrationserhöhung von DNA, wurde das Probenvolumen in der 1,5-fachen Menge 100 % Ethanol aufgenommen und mit 0,19 M Kaliumacetat versetzt. Anschließend wurde das Gemisch für 30 min bei -20 °C inkubiert und die gefällte DNA bei 13000 rpm für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 20 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 4.1.3 Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen

Der gewünschte Stamm wurde zuvor auf einer LB-Agarplatte bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Vorkultur (LB-Medium) inokuliert und über Nacht bei 36 °C und 200 rpm inkubiert. Eine 50 ml Hauptkultur wurde 1/20 inokuliert und bei 36 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C geerntet. Anschließend wurde das Pellet in 15 ml eiskaltem TFB-I-Puffer aufgenommen und für 2 h auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren wurde das Pellet in 2 ml TFB-II-Puffer resuspendiert, in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 4.1.4 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen, wurde der gewünschte Stamm auf einer LB-Agarplatte bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 50 ml Vorkultur (LB-Medium) inokuliert und über Nacht bei 36 °C und 200 rpm inkubiert. Eine 50 ml Hauptkultur wurde 1/20 inokuliert und bei 36 °C, 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 bis 0,9 inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C geerntet. Anschließend wurde das Pellet in 30 ml eiskaltem sterilem dH<sub>2</sub>O aufgenommen und erneut pelletiert. Der Waschschrift wurde wiederholt. Nach erneutem Pelletieren wurde das Pellet in 5 ml eiskalten 10 % Glycerin aufgenommen. Wurden mehrere Kulturen von einem Klon inkubiert, wurde nach diesem Schritt vereinigt und erneut pelletiert. Abschließend wurden die Zellen in 450 µl eiskalten 10 % Glycerin aufgenommen, in 50 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 4.1.5 Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen

Die Transformation wurde mit einem 50 µl Aliquot chemisch-kompetenten Zellen durchgeführt. Dazu wurde das Aliquot mit 60 ng bis 200 ng Plasmid DNA versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Nach dem Hitzeschock erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden anschließend mit 450 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen pelletiert, in 200 µl LB-

Medium aufgenommen und auf LB-Agar Platten mit den entsprechenden Selektionsmarker ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C, mit anschließender Lagerung bei 4 °C.

### **4.1.6 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen**

Die Transformation wurde mit einem 50 µl Aliquot an elektrokompetenten Zellen durchgeführt. Dazu wurde das Aliquot mit 60 ng bis 200 ng Plasmid DNA (mit einem Maximalvolumen von 1,5 µl) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Elektroporation bei 2,25 kV. Im Folgenden wurde erneute auf Eis für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 950 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen pelletiert, in 200 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Agar Platten mit den entsprechenden Selektionsmarker ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C anschließend wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

### **4.1.7 Plasmidisolation aus *E. coli* Zellen**

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurde eine Isolation aus *E. coli* Zellen durchgeführt. Hierfür wurde eine Übernachtskultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (1/1000) versetzt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (8000 rpm, 3 min). Die pelletierten Zellen wurden nach Vorschrift des QIAquick Spin Minipräparationsset von *Qiagen* bearbeitet, welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht. Die abschließende Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit dem EB-Puffer (35 µl bis 50 µl) des QIAquick Spin-Mini-Präparationssets.

### **4.1.8 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren. Eine Absorption bei 260 nm von 1 entspricht 50 ng/µl doppelsträngiger DNA, wie der Zusammenhang in Gleichung (1) zeigt.

$$c_{dsDNA}[ng/\mu l] = OD_{260nm} \cdot 50 ng/\mu l \quad (1)$$

Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt, hier absorbieren die aromatischen Reste der Proteine. Um über das Verhältnis von  $OD_{260nm}$  zu  $OD_{280nm}$  die Reinheit der DNA abzuschätzen, welches idealerweise zwischen 1,5 und 2,0 liegt.

### 4.1.9 Restriktionsverdau

Die Eigenschaft von Restriktionsenzymen an palindromischen Sequenzen zerschneiden wird hier genutzt, um DNA in analytischen oder präparativen Mengen zu verdauen. Durchgeführt wurde der Restriktionsverdau für mindestens 1 h bei 37 °C. In Tabelle 12 ist der Ansatz für den analytischen und präparativen Verdau aufgeführt.

**Tabelle 12:** Zusammensetzungen der Reaktionsgemische für den Restriktionsverdau.

	analytischer Verdau / (v/v) %	präparativer Verdau / (v/v) %
DNA	10	70
Puffer	10	10
Enzym I	1	4
Enzym II	1	4
Enzym III	1	4
dH <sub>2</sub> O	77	8

### 4.1.10 In vitro Ligation

Die Ligation wird durchgeführt, um zwei DNA-Fragment miteinander zu verknüpfen, wie zum Beispiel um ein Insert in einen Vektor zu integrieren. Voraussetzung für eine erfolgreich Ligation ist das Vorhandensein von kompatiblen Schnittstellen im Insert und Vektor. Für einen Ligationsansatz wurden Insert und Vektor in einem Verhältnis von 7:1 miteinander vermischt, nachdem der präparative Restriktionsverdau durchgeführt wurde. Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Anschließend die Transformation in kompetente *E. coli* Zellen. In Tabelle 13 ist der Ansatz des Ligationsmixes aufgeführt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz nur mit dem verdauten Vektor angesetzt, um die Eigenligation abzuschätzen.

**Tabelle 13:** Ligationsansatz für die *in vitro* Ligation.\* abhängig von der Konzentration des Insert und Vektors, das Verhältnis sollte 7:1 betragen.

	Menge / µl
T4-Ligase	1
10x T4-Puffer	2
Vektor	*
Insert	*
dH <sub>2</sub> O	ad 20

### 4.1.11 Gelelektrophorese

Diese Methode dient zur Auftrennung von DNA nach Größe. Die Präparation des Gels erfolgt mit 1 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer oder TAE-Puffer. Der TBE-Puffer wurde verwendet, wenn ein Gel von höherer Festigkeit vonnöten war. Das Gemisch wurde aufgeheizt, bis die Agarose vollständig gelöst war und anschließend nach dem Abkühlen auf ~50 °C mit 5 µl Midori-Green versetzt. Das Agarose-Gel wurde in einer Gelkammer mit Kamm ausgegossen. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entfernt und das Agarose-Gel mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Von den Proben wurden 5 µl aufgetragen, welche vorher mit 5x Ladepuffer versetzt wurden. Als Größenstandart, wurde der Massruler (M0403) von *ThermoFisher* verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung bei 120 V für 1 h und abschließend wurde das Agarose-Gel unter UV-Licht analysiert.

### 4.1.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA zur Überprüfung auf ihrer Richtigkeit erfolgt durch die Firma *GATC Biotech*, später übernommen durch *Eurofins Genomics*.

### 4.1.13 Präparation von kompetenten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen

Der gewünschte Stamm wurde zuvor auf einer Agarplatte (YPD oder SC) und den korrespondierenden Bedingungen bei 30 °C für 2 d inkubiert. Anschließend wurde eine 3 ml Vorkultur angesetzt (YPD-Medium oder LFM-Medium) und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Eine 50 ml Hauptkultur wurde auf OD<sub>600</sub> 0.1 eingestellt und für 5-6 h bei 30 °C und 100 rpm inkubiert. Die Zellen wurden für 3 min bei 2000 rpm geerntet. Dann wurden zwei Waschschrte mit 25 ml sterilen dH<sub>2</sub>O und 5 ml SORB-Puffer durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen in 450 µl SORB-Puffer mit 50 µl Lachssperma-DNA resuspendiert, aliquotiert (50 µl) und bei -80 °C gelagert. Die Lachssperma-DNA wurde vorher für 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend für 10 min auf Eis gekühlt.

### 4.1.14 Transformation von chemisch-kompetenten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen

Ein Aliquot kompetenter Hefezellen wurde mit 5 µl DNA versetzt und vermischt, anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl PEG-Puffer. Nach erneutem Mischen wurde das Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500 µl YPD-Medium gewaschen. Bei der Selektion gegen ein Antibiotikum wurden die Hefezellen für 6 h bei 30 °C und



100 rpm geschüttelt. Abschließend wurden die Zellen in 200 µl YPD-Medium aufgenommen und ausplattiert.

### **4.1.15 *In vivo* Ligation in *Saccharomyces cerevisiae***

Für die *in vivo* Ligation werden, wie in der *in vitro* Ligation, ein Insert und ein verdauter Zielvektor benötigt. Um die einzusetzende Menge abzuschätzen, werden der Verdau und die Amplifikation des Inserts per Agarosegel überprüft. Das Verhältnis von Insert zu Vektor sollte etwa 3:1 betragen. Anschließend wurden die beiden Komponenten zu einem Aliquot chemisch-kompetenter Hefezellen hinzugegeben und die Transformation der Hefezellen durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Hefezellen jeweils einmal mit dem verdauten Vektor und dem Insert separat transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen ausplattiert und für 2 d bei 30 °C inkubiert.

### **4.1.16 Isolation von DNA aus *Saccharomyces cerevisiae***

Zur Isolation von DNA aus *S. cerevisiae* wurde eine ausreichende Menge an Zellen von der Selektionsplatte genommen. Die Zellen wurden in 500 µl Breaking-Puffer mit 200 µl Glasperlen (Ø: 0,25 bis 0,5 mm) aufgenommen und mit 500 µl Rotiphenol versetzt. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min auf der Multivortex geschüttelt. Die Zelltrümmer und Glasperlen wurden bei 13000 rpm für 10 min pelletiert. Von der wässrigen Phase wurden 400 µl entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml von -20 °C kalten 100% Ethanol versetzt und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA bei 13000 rpm für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Nach der Zugabe von 1 ml 70% Ethanol, wurde das nicht resuspendierte Pellet erneut 13000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 20 µl sterilem dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **4.1.17 Integration von DNA-Sequenzen in das Genom von *Saccharomyces cerevisiae***

Für die Integration von DNA-Sequenzen in das Hefegenom, wurde eine PCR nach dem Reaktionsmische in Tabelle 10 und dem Programm aus Tabelle 11 durchgeführt. Anschließen wurde das PCR- Produkt per Agarosegel kontrolliert, konzentriert und schließlich wurden chemisch-kompetente Hefezellen damit transformiert. Anschließend wurde auf die Antibiotikaresistenz der zu integrierenden Genkassette, selektiert. Nach abgeschlossener Selektion wurden die Transformaten auf ihre Richtigkeit durch eine Test-PCR überprüft, dazu wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Die zu testenden Klone wurden zuvor im PCR-Reaktionsgefäß aufgeköcht. Eine weitere Kontrolle, ob

die Integration erfolgreich war erfolgte über die Beobachtung durch das Mikroskop, in dem die Fluoreszenz des Fluoreszenz-Tags der Genkassette überprüft wurde.

### 4.1.18 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurde standardmäßig in LFM-Medium für Fluoreszenzmessungen oder in YDP-Medium bei 30 °C und 100 rpm durchgeführt. Für jede Hauptkultur wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Vorkultur angezogen und die Hauptkultur 1/20 inokuliert. In dieser Arbeit wurden *S. cerevisiae* Stämme erzeugt, die aufgrund ihres Genotyps nur unter definierten Lichtbedingungen wachsen. Die entsprechenden Bedingungen sind Tabelle 7 zu entnehmen. In der folgenden Tabelle 14 sind die verwendeten Wellenlängen, die zur Kultivierung von Hefen verwendet wurden, aufgeführt.

**Tabelle 14:** Verwendete Wellenlänge des Lichtes zur Kultivierung von *S. cerevisiae*.

Licht	Wellenlänge
blau	465 nm und 470 nm
grün	530 nm
rot	630 nm
Dunkelheit	-

### 4.1.19 Fluoreszenzmessungen von fluoreszenzmarkierten Proteinen in *S. cerevisiae*

Um die Menge an Protein in den *S. cerevisiae* zu bestimmen, wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Bei beiden aufgeführten Methoden wurden Wildtyp-Zellen als Hintergrund Korrektur gemessen. Unter Verwendung des Fluorierter Synergy MX Fluorimeter (*BioTek*) wurde wie folgt vorgegangen: Das Zellwachstum wurde mit Natriumazid (10 mM) gestoppt. Die Menge an Hefezellen die einer OD<sub>600</sub> von 1 entsprachen, wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (2000 rpm, 3 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl LFM-Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte der Transfer in eine 96-well Platte. Die für die Messungen verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 15 gelistet. Zur Messung der Fluoreszenz einzelner Zellen wurde das Zytometer Attune NxT (*ThermoFisher Scientific*) verwendet und es wurde wie folgt vorgegangen: Nach dem das Zellwachstum mit 10 mM Natriumazid gestoppt wurde, wurden die Zellen in einer 96-well Platte verdünnt (ca. 30000 Zellen pro 200µl). In folgender Tabelle 16 sind die entsprechenden Systemeinstellungen aufgeführt. Die Streuung FSC-H gegen FSC-A wurde genutzt, um einzelne Zellen zu selektieren. Die gemittelte Fluoreszenz (*Mean value*) wurde ausgelesen und ausgewertet.

**Tabelle 15:** Parameter für die Messungen am Fluorimeter.

	Parameter	Wert
Filtereinheit 1	Schüttung	Medium, 0,05 s
	Lesegeschwindigkeit / Verzögerung	Normal / 100 ms
	Datenpunkte	10
	Lesehöhe	8 mm
	Anregung GFP	480 nm / 17,0
	Emission GFP	515 nm / 17,0
	Optik	Über der Platte
Filtereinheit 2	Gain	120
	Anregung mCherry	580 nm / 13,5
	Emission mCherry	615 nm / 13,5
	Optik	Über der Platte
	Verstärkung	140

**Tabelle 16:** Parameter für die Messung von einzelnen Zellen am Zytometer.

Parameter	Wert
Fluss	100 µl/min
Probenvolumen	200 µl
Blauer Laser	488 nm
Gelber Laser	561 nm
GFP/YFP Bandpassfilter	530/30 nm
RFP Bandpassfilter	620/15 nm
Stop	30 000 Events

### 4.1.20 Westernblot Analyse

Das Zellwachstum der Hefezellen wurde mit 10 mM Natriumazid gestoppt, die Menge an Zellen die einer OD<sub>600</sub> von 1 entsprechen entnommen und mit 150 µl alkalischem Lyse-Puffer versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden 150 µl 55 % TCA hinzugegeben und erneut wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (13000 rpm, 10 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl HU-Puffer gelöst und bei 65 °C für 10 min denaturiert. Bevor 10 µl Probe auf das SDS-PAGE geladen wurden, wurden die Proben erneut zentrifugiert (13000 rpm, 3min). Das SDS-PAGE wurde erst für 10 min bei 80 V durchgeführt, anschließend erfolgt die Auftrennung dieser bei 200 V für 50 min. Für den Proteintransfer wurde das Gel mit Nitrocellulosemembran in Whatman-Papier gehüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Blasen zwischen Gel und Membran befinden. Die Anordnung erfolgte so, dass die negativ

geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran migrieren die dem positiven Pol zugewandt ist. Die Migration erfolgt über 12 h bei 20 V in 1x Blotting-Puffer. Anschließend wurde die Membran mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 10% (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer für 1 h bei 75 rpm inkubiert. Nach dem Blocken, wurde die Membran mit TBST-Puffer dreimal gewaschen und anschließen für 1 h bei 75 rpm in 5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer mit dem ersten Antikörper inkubiert. Nach diesem Schritt wurde erneut dreimal in TBST-Puffer gewaschen. Die Membran wurde nun mit dem zweiten Antikörper in 5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer für 1 h bei 75 rpm inkubiert. Der zweite Antikörper ist mit der Meerrettichperoxidase fusioniert, die eine Detektion basierenden auf der Chemolumineszenz ermöglicht. Vor der Detektion, wurde die Membran sechsmal in TBST-Puffer gewaschen und für 1 min in frischer ECL-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgt die Detektion an der Westernblot-Detektionsstation. Um noch weitere Proteine zu detektieren, wurden die Antikörper mit dem Strippingpuffer für 30 min bei 75 rpm entfernt. Anschließend wurde für 3 min bei 75 rpm mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Inkubationsschritte vom Blocken bis zur Detektion wurden wie oben beschrieben wiederholt. In der nachfolgenden Tabelle 17 sind die verwendeten Antikörper und Arbeitskonzentrationen aufgeführt.

**Tabelle 17:** Verwendete Antikörper für die Immundetektion.

Verwendung	Antikörper	Konzentration
Erster Antikörper	Maus anti GFP	1:2000
	Hase anti mCherry	1:1000
	Hase anti Tubulin	1:10000
Zweiter Antikörper	Ziege anti Maus	1:3000
	Ziege anti Hase	1:3000

### **4.1.21 Wachstumstest SC-Agar Platten**

Die Zellen wurden in 1 ml dH<sub>2</sub>O auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und anschließend viermal 1:5 verdünnt. Dabei wurde von jeder Verdünnung ein 5 µl Tropfen auf die SC-Agar Platten gesetzt. Die Platten wurden für 2-7 Tage bei 30 °C und den gewünschten Lichtbedingungen inkubiert. Es wurden mindestens 3 biologische Replikate durchgeführt.

### **4.1.22 Wachstumstest in Flüssigmedium**

Von einer Vorkultur wurde die Hauptkultur auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,1 in LFM-Medium eingestellt. Anschließend wurde bei 30 °C, 90 rpm und der entsprechenden Lichtbedingung inkubiert. Nach 7 h

wurde der erste Zeitpunkt von der Wachstumskurve aufgenommen, dafür wurden 100 µl der Hauptkultur entnommen, in 10 mM Natriumazid 1:10 verdünnt und anschließend wurde die OD<sub>600</sub> gemessen. In den folgenden 9 h wurde jede weitere Stunde ein Messpunkt entnommen.

### 4.1.23 Verfolgung der Msn2-mCherry Lokalisation in *S. cerevisiae* per Mikroskop

Die lebenden *S. cerevisiae* Zellen wurde mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop, mit einer Hamamatsu Kamera und einem Plan-Apochromat 63x71.4 NA Öl-Objektiv beobachtet. In der folgenden Tabelle 18 sind die Filtereinstellungen gelistet. Für die Bildersammlung wurde die Volocity 5.03 (*Perkin Elmer*) Software verwendet. Die Bilder wurden als Fluoreszenzbilder mit einem Abstand der Ebenen von 0,5 µm aufgenommen. Die Zellen wurden, nachdem das Dunkelbild aufgenommen wurde, für 3 min mit Blaulicht (450 nm) beleuchtet. Anschließend wurde über 8 min die Dunkeladaption beobachtet, wobei alle 2 min ein Bild aufgenommen wurde. Für die Quantifizierung und Auswertung wurde das Programm *ImageJ*.<sup>99</sup> verwendet.

**Tabelle 18:** Verendete Parameter für die mikroskopischen Untersuchungen.

Fluorophor	Parameter	Werte
eGFP	Belichtungszeit	100 ms
	Verstärkung	255
	Anregungsfilter	470+/-20 nm
	Emissionsfilter	525+/-25 nm
	Beamsplitter	490+/-10 nm
RFP	Anregungsfilter	570+/-10 nm
	Emissionsfilter	620+/-30 nm
	Beamsplitter	485+/-5 nm

### 4.1.24 Bestimmung des cAMP-Levels in *S. cerevisiae*

Die Hauptkultur wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 1 eingestellt und für 1 h bei 30 °C und 90 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf 4 °C transferiert und pelletiert (2000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zweimal mit 500 µl Medium in ein Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (2000 rpm, 4 °C, 5 min). Im nächsten Schritt, wurde das Pellet in eiskalter Extraktionslösung (Acetonitril/Methanol/MQ Wasser: 2:2:1) aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Gefolgt von einer Inkubation bei 95 °C für 10 min und ein Herabkühlen auf Eis. Anschließend wurde pelletiert (13000 rpm, 4 °C, 10 min) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde zweimal mit je 200 µl Extraktionslösung wiederholt,

jedoch wurde die Inkubation bei 95 °C übergangen. Das restliche Pellet wurde zur Bestimmung der Proteinmassen verwendet. Die gesammelten Überstände wurden über Nacht bei -20 °C gelagert und erneut pelletiert (13000 rpm, 4 °C, 10 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei 45 °C mit Hilfe der Speedvac von *Eppendorf* getrocknet. Die trockenen Proben wurden an die „Research Core Unit Metabolomics“ der medizinischen Hochschule Hannover für HPLC/MS Detektion gesendet. Die HPLC/MS Analyse wurde wie in von *Bähre et al* und *Beste et al* beschrieben durchgeführt.<sup>100,101</sup> Das getrocknete Pellet wurde in 800 µl 0,1 M NaOH aufgenommen und für 15 min bei 95 °C inkubiert, anschließend wurden die Proben pelletiert (13000 rpm, 4 °C, 15 min). Vom Überstand wurden 75 µl entnommen und mit 92,5 µl 1 M NaOH, 132,5 µl dH<sub>2</sub>O und 100 µl CuSO<sub>4</sub> versetzt. Die Proben wurden erneut, nach 5 min Inkubationszeit, pelletiert (13000 rpm, 5 min) und 250 µl des Überstandes wurden in eine 96-well Platte (flat-bottom, transparent) überführt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge 550 nm gemessen. Als Kalibration diente ein BSA-Standard, der in verschiedene Konzentration in 0.1 M NaOH gelöst wurde.

### 4.2. Proteinbiochemische Methoden

#### 4.2.1 Proteinüberproduktion

Ein *E. coli* Klon mit dem gewünschten Expressionsplasmid wurde zum Inokulieren einer Vorkultur mit 72 µM Kanamycin verwendet, die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 90 rpm inkubiert. Anschließend wurden 2 L LB-Medium mit 72 µM Kanamycin im Verhältnis 1:20 mit der Vorkultur inokuliert. Als Nächstes wurde die Hauptkultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 bei 37 °C und 90 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 18 °C herabgesetzt und die Proteinüberproduktion durch 10 µM IPTG induziert. Nach einer Wachstumszeit von 18-20 h bei 18 °C und 90 rpm wurden die Zellen mit Hilfe eines *JA-10* Rotors (*Beckmann*) bei 4 °C und 5000 rpm für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Ni-NTA-Puffer A resuspendiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.2.2 Proteinisolation und Proteinreinigung

Für den Zellaufschluss, wurde das resuspendierte Zellpellet mit 5 µl Lysozym (50 mg/ml) und DNaseI für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss mittels French-Press bei 1000 psi. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, um ein vollständiger Aufschluss zu garantieren. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren mit einem *JA-20* Rotors bei 15000 rpm, 4 °C für

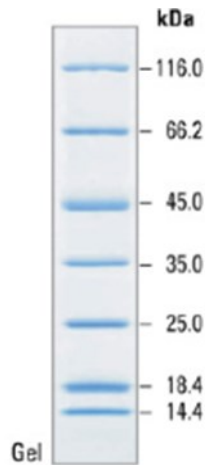
60 min abgetrennt und das Lysat wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter ( $\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$ ) geklärt. Das Lysat wurde auf eine IMAC-Säule geladen und mittels linearen Gradienten des Ni-NTA-Puffer-B mit einem Fluss von 1 ml/min eluiert ( $4^\circ\text{C}$ ,  $p_{\text{max}}$ : 0,5 MPa). Die Detektion erfolgte über einen UV/VIS Detektor bei den Wellenlängen 280 nm, 390 nm, 450 nm (AuLOV) oder 280 nm und 610 nm (mCherry-3myc-AuLOV-cODC1). Vor dem Gradienten wurde die Ni-NTA-Säule mit 3 Säulenvolumen 5 % Ni-NTA-Puffer B gewaschen um grobe Verunreinigungen zu beseitigen. Abschließend wurde mit einem Säulenvolumen 100 % Ni-NTA-Puffer B gewaschen. Die gewünschten Fraktionen wurden vereinigt, auf ein Volumen von 1 ml konzentriert und mittels SEC (Superdex 200 16/60 oder Superdex 26/60) nochmals gereinigt. Als mobile Phase diente TRIS-Puffer (Fluss: 1 ml/min,  $P_{\text{max}}$ : 0,50 MPa. UV/VIS Detektion: 280 nm, 390 nm, 450 nm (AuLOV) oder 280 nm und 610 nm (mCherry-3myc-AuLOV-cODC1)). Die Fraktionen mit dem gewünschten Protein wurden erneut vereinigt und konzentriert. Die Reinheit wurde per SDS-PAGE überprüft und die Konzentration durch die Bradfordmethode bestimmt. Abschließend wurden die Proteinproben aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 4.2.3 SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinheit von Proteinen

Die Proteinproben wurden 1:5 mit Ladepuffer versetzt und für 15 min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf eine SDS-PAGE aufgetragen. In der Tabelle 19 ist die Zusammensetzung der unterschiedlichen SDS-PAGEs aufgeführt. Als Größenstandart, wurde der *Unstained Protein Marker Pierce (Thermo scientific)* verwendet (**Abbildung 12**). Die Proteine wurden für 60 min bei 200 V nach Größe separiert. Das SDS-PAGE wurde in Färbelösung für 1 min aufgekocht und für 15 min inkubiert. Das gefärbte SDS-PAGE wurde abschließen mit Wasser und Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar waren.

**Tabelle 19:** Zusammensetzung der SDS-PAGEs.

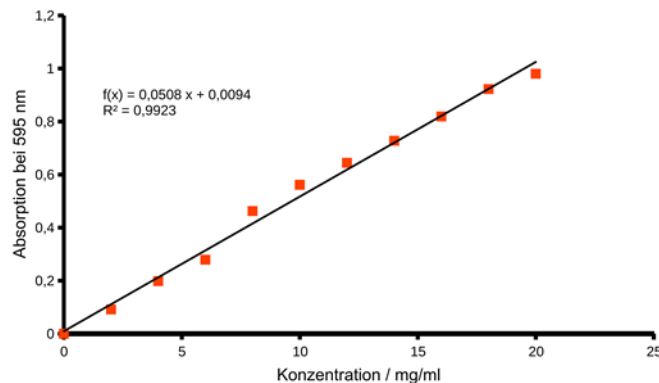
Trenngel	10%	12,5%	15%	Sammelgel	
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	Sammelgelpuffer	2,5 ml
Wasser	3,89 ml	3,02 ml	2,2 ml	Wasser	5,16 ml
Acrylamid	3,3 ml	4,17 ml	5,0 ml	Acrylamid	1,32 ml
10 % SDS	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	10 % SDS	100 $\mu\text{l}$
TEMED	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	TEMED	5 $\mu\text{l}$
10 % APS	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	10 % APS	100 $\mu\text{l}$



**Abbildung 12:** Größenstandart für die SDS-PAGE von *Thermofischer Unstained Protein Marker Pierce*.

### 4.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Bradfordmethode

Coomassie Brilliant-Blue G-250 interagiert mit hydrophoben und kationischen Seitenketten des Proteins, was das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verschiebt.<sup>102</sup> Für die Bestimmung der Proteinkonzentration, wurden 0,5 µl bzw. 1 µl (abhängig von der Konzentration um im linearen Bereich zubleiben) des Proteins mit 1000 µl Bradfordlösung (1x) gemischt und für 5 min und bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Über eine Kalibrationsgerade (**Abbildung 13**) wurde anschließend die Proteinkonzentration bestimmt.



**Abbildung 13:** Bradford-Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration.

### 4.2.5 Analytische SEC-Chromatographie

Für die analytische SEC wurde die Superdex 75 10/300 GL als chromatographische Säule verwendet (Injektionsvolumen: 500 µl, Injektionszeit: 2 min, Fluss: 0.5 ml/min,  $P_{\max}$ : 2,80 MPa, UV/VIS Detektion: 280 nm, 390 nm, 450 nm, Temperatur: 4 °C). Als mobile Phase wurde Tris-Puffer



verwendet und das Protein wurde mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgetragen. Für die Verdünnungsreihe wurden folgende Konzentrationen verwendet und aufgetragen; 0,125 mg/ml, 0,063 mg/ml, 0,032 mg/ml and 0,016 mg/ml. Dunkelproben wurden vorher 48 h in Dunkelheit inkubiert, wobei Lichtproben vorher für 30 min mit Blaulicht (455 nm,  $7,6 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) bestrahlt wurden. Als Größenstandard zur Abschätzung der Molekularmasse wurden die in der Tabelle 20 gelisteten Proteine mit ihren Elutionsvolumen verwendet. Die Kalibrationsgerade befindet sich im Anhang unter der Abbildung 44.

**Tabelle 20:** Größenstandards der analytischen SEC.

Protein	Elutionsvolumen / ml	MM / kDa
Conalbumin	9,39	75,0
Ovalbumin	10,39	43,0
Careboanydrase	11,59	29,0
Ribonuclase A	13,82	13,7
Aprotin	15,98	6,5

### 4.2.6 UV/VIS Spektroskopie

Proteinproben für die UV/VIS Spektroskopie wurden mindestens für 48 h im Dunkeln inkubiert. Die Konzentration der Proben betrug 1 mg/ml, das Probenvolumen 200  $\mu\text{l}$  und die Schichtdicke der Küvette 1 cm. Die UV/VIS Spektren wurden von 250 nm bis 800 nm bei 10 °C mit dem *JASCO V-660* Spektrometer aufgenommen. Nach der Aufnahmen des Dunkelspektrums, wurde die Proben mit Blaulicht (455 nm,  $7,6 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) beleuchtet und bei folgenden Zeitpunkten ein Spektrum aufgenommen: 1 s, 2 s, 5 s, 10 s, 15 s, 30 s, 60 s, 120 s, 300 s, 600 s, 900 s, 1200 s und 1800 s. Anschließend wurde die Dunkeladaption beobachtet, dafür wurden die Proben im Dunkeln inkubiert und bei folgenden Zeitpunkten ein Spektrum aufgenommen: 60 s, 120 s, 300 s, 600 s, 900 s, 1200 s, 1800 s, 2700 s, 3600 s und 5400 s. Die Auswertung erfolgte mit Origin 7.0. Alle Spektren wurden bei 800 nm auf null gesetzt. Die spezifische FMN-Absorption bei 447 nm wurde gegen die Zeit aufgetragen und auf den Startwert normalisiert. Abschließend wurde aus den drei Triplikaten eine Mittelwertkurve erstellt und ein exponentieller Zerfall erster Ordnung zur Ermittlung der kinetischen Parameter angenommen.

### 4.2.7 Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS)

Zur Aufnahme von SAXS-Kurven (*small angle X-ray scattering*) wurden die zu vermessenden Proteinproben zunächst gegen den Puffer, der als Hintergrundspektrum verwendend wurde, über Nacht dialysiert. Die Zusammensetzung des Puffers muss für das Protein und die Referenz gleich sein, da es sich um eine kontrastbasierte Methode handelt.<sup>103</sup> Die Verdünnungsreihen wurden mit einem Volumen von 50-100 µl pro Verdünnung angesetzt. Die Dunkelproben wurden für mindestens 48 h in Dunkelheit inkubiert und die Lichtproben wurden mit Blaulicht (455 nm) für 30 min vor der Messung beleuchtet. Die Experimente wurden an der Beamline P12 in Hamburg am PETRA III Synchrotron durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem *ATSAS*-Programmpaket.<sup>104</sup> Dafür wurden die Kurven bei den verschiedenen Konzentrationen (9 mg/ml, 4,5 mg/ml, 2,25 mg/ml und 1,13 mg/ml) gemittelt um einen Konzentrationseffekt auszuschließen.

### 4.2.8 Proteinkristallisation und Strukturlösung

Nach der Proteinreinigung und Konzentration, wurden die Proben für die Kristallisation filtriert (5000 rpm, 4 °C, 10 min). Proben für die Kristallisation unter Lichtausschluss, wurden vor dem Setzen der Kristallisationstropfen für mindestens 12 h im Dunkeln inkubiert und unter Sicherheitslicht (Rotlicht) gehandhabt. Die Kristallisationsplatten wurden von den Mitarbeitern des *MarXtals* (*Marburg Kristallisationslabor, Philipps Universität Marburg*) mit Hilfe eines Kristallisationsroboters in 96-well Platten gesetzt und bei 18 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Hier wurde das *sitting drop* Verfahren verwendet. Bei Verwendung des *hanging drop* Verfahrens wurden die Tropfen händisch gesetzt und die Inkubation erfolgte bei 18 °C. Die Daten wurden am SLS (*Villingen, Schweiz*) gesammelt. Für die Strukturlösung der auto-prozessierten Daten und die Verfeinerung wurde das CCP4i Paket und Phenix verwendet.<sup>105,106</sup> Die Analyse und Darstellung der Strukturen erfolgt mit *Pymol*.<sup>107</sup>

### 4.2.9 Bioinformatische Analyse von Dimerinteraktionsflächen

Die Analyse der Kristallstrukturen erfolgte über das Onlineprogramm PDBeFOLD auf dem EBI-Server.<sup>108</sup> Dazu wurde die Option zum individuellen Vergleich der Ketten ausgeschaltet. Mit Hilfe dieses Servers wurde nach ähnlichen Dimeranordnungen in der Interaktionsfläche mit mindesten 75 % Übereinstimmung gesucht. Die Analyse der Interaktionsflächen erfolgte mit dem *PISA*-Server.<sup>109</sup>

#### **4.2.10 Erstellung eines Homologiemodells mit Chimera**

Zur Erstellung eines Homologiemodells wurde das Programm Chimera verwendet.<sup>110</sup> Als Sequenz des Homologiemodells wurde die Proteinsequenz des gewünschten Modelles verwendet. An dieser wurden Sequenzen der PDB-Einträge, die als Strukturvorlage dienen ausgerichtet. Anschließend erfolgt die Erstellung eines Homologiemodells mit dem Programm Modeller in Chimera.<sup>110</sup>

## 5 Ergebnisse

Im ersten Teil der Ergebnisse wird die proteinchemische und strukturelle Charakterisierung der AuLOV Mutanten beschrieben. Mit Hilfe zweier Kristallstrukturen konnte eine neuartige Dimeranordnung der AuLOV-Domäne gefunden werden, welche anschließend bioinformatisch untersucht wurde. Im zweiten Teil wurde ein lösliches mCherry-AuLOV-cODC1 proteinchemisch charakterisiert. Im dritten Teil wurde basierend auf den Daten der vorangegangenen Masterarbeit aus der AuLOV-Domäne und dem psd-Modul eine optogenetische Applikation entwickelt um das cAMP-Level in *S. cerevisiae* zu kontrollieren. Abschließend im vierten Teil wurde CraCry aus *C. reinhardtii* im psd-Modul getestet um grundlegende Informationen über CraCry als optogenetisches Modul zugewinnen.

### 5.1 Proteinchemische und strukturelle Charakterisierung von AuLOV-Mutanten

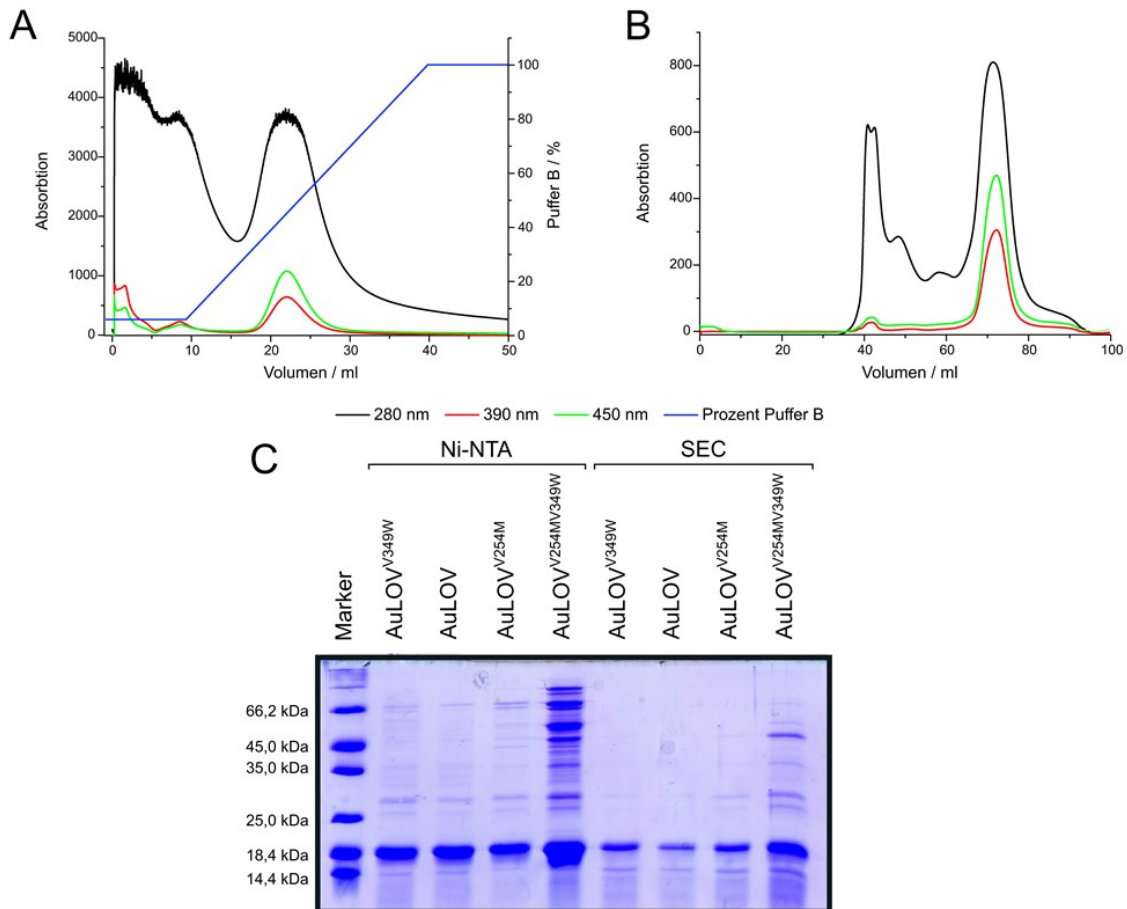
Zur Entwicklung von optogenetischen Anwendungen ist das Verständnis von den verwendeten Photorezeptoren unabdingbar. In der vorangegangenen Masterarbeit wurden verschiedene Mutanten der AuLOV-Domäne entwickelt und charakterisiert. Die Mutanten AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup> zeigten in ersten *in vivo* Experimenten die besten Ergebnisse mit einem neuartigen Schaltverhalten. Von der Mutante AuLOV<sup>V349W</sup> wurde sogar eine Kristallstruktur erhalten. Ziel in dieser Arbeit ist daher die Mutanten AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup> sowie eine Doppelmutante aus beiden AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> vollständig proteinchemisch und strukturell zu charakterisieren, sowie eine vollständige Charakterisierung der Kristallstruktur. Für ein besseres Verständnis der Dimerisierung, soll eine bioinformatische Analyse der Dimerinteraktionsflächen erfolgen. Weiterhin wurde ein lösliches *in vivo* Konstrukt charakterisiert.

#### 5.1.1 Reinigung der AuLOV-Mutanten

Die Reinigung der AuLOV-Mutanten (AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>, AuLOV<sup>V254M</sup>, AuLOV<sup>V349W</sup>) und des Wildtyps erfolgte nach einem früheren Protokoll von *Banerjee et al.*<sup>36,83</sup> Die Reinigungsschritte für die AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante werden exemplarisch gezeigt. Die Reinigung der mit einem HisTag versehenen AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Domäne erfolgt im ersten Schritt über IMAC mittels Imidazolgradienten. Die Elution der Mutanten erfolgte bei 44 % Imidazol (100 % = 500 mM) (**Abbildung 14 A**). Die anderen Mutanten eluierten bei 40 % bis 50 % Imidazol (100 % = 500 mM). Anschließend wurde die AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> Domäne mittels SEC (Superdex 200 16/60) gereinigt (**Abbildung 14 B**) und konzentriert. Das Elutionsvolumen für die AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Domäne liegt

## 5 Ergebnisse

bei 72 ml (**Abbildung 14 B**), das Elutionsvolumen der restlichen Mutanten liegt ebenfalls bei 72 ml. Die gereinigten Mutanten wurden konzentriert und die Reinheit per SDS-PAGE überprüft (**Abbildung 14 C**). Die Verunreinigungen, die noch in den Fraktionen der IMAC zuerkennen sind, wurden weitest gehend durch die SEC abgetrennt (**Abbildung 14 C**). Die Mutanten zeigen die erwartete Molekularmasse von 17,9 kDa; pro Liter Expressionskultur wurden im Mittel 5 g gereinigtes Protein erhalten.



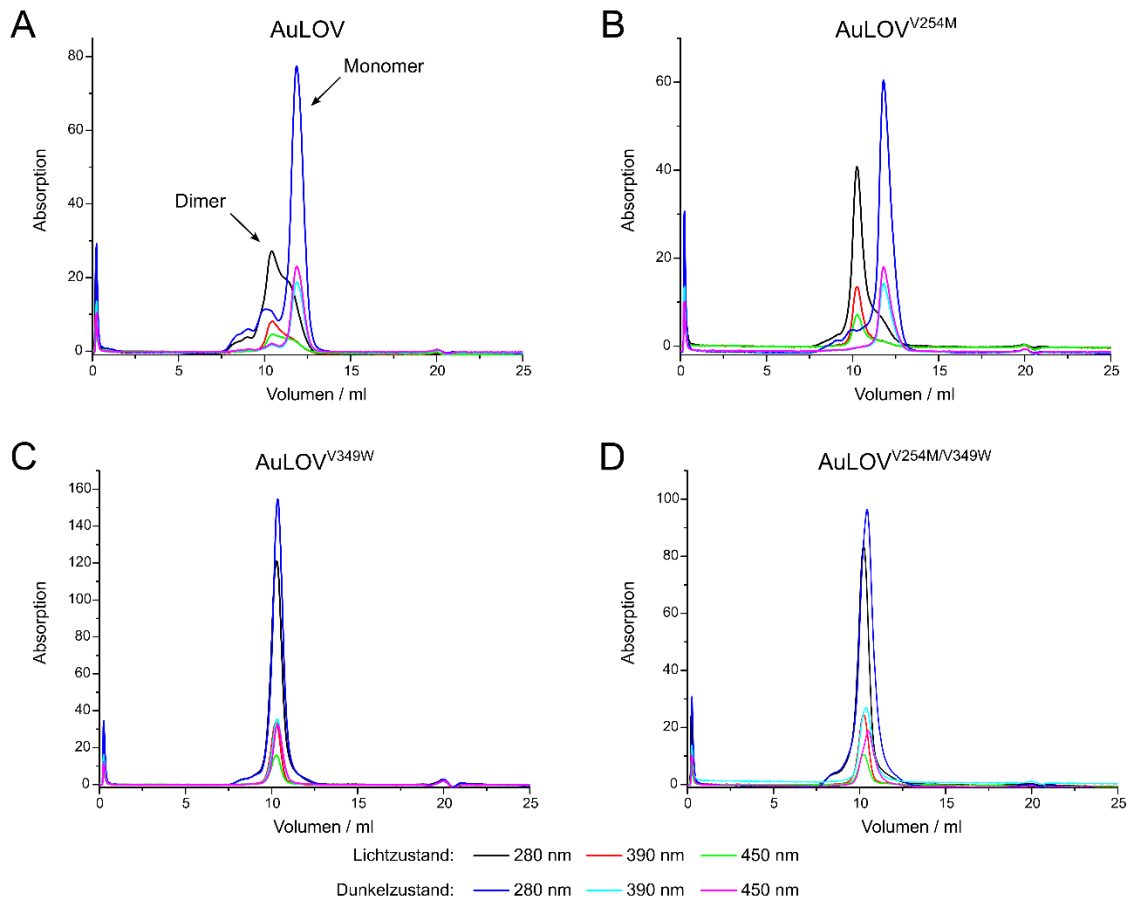
**Abbildung 14:** Exemplarische Reinigung der AuLOV Doppelmutante. **A:** IMAC- Chromatogramm der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante. Die Elution erfolgte über einen linearen Imidazolgradienten, die Elution erfolgte bei 44 % Imidazol (100 % = 500 mM). **B:** Chromatogramm der SEC-Chromatographie von AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>, das Elutionsvolumen beträgt 72 ml. **C:** SDS-PAGE der gereinigten AuLOV-Mutanten, die vereinigten Fraktionen der IMAC und der SEC wurden aufgetragen. Die Reinheit der Proben wird durch die SEC erhöht. Die Proteinbanden zeigen die erwartete Molekularmasse von 17,9 kDa.

### 5.1.2 Bestimmung des oligomeren Zustandes der AuLOV-Mutanten mittels analytischer SEC

Um den oligomeren Zustand der Mutanten nach Beleuchtung mit Blaulicht und in Dunkelheit abzuschätzen, wurden analytische SEC Untersuchungen der AuLOV-Mutanten bei einer Konzentration von 1 mg/ml durchgeführt (**Abbildung 15**). Der AuLOV-Wildtyp zeigt literatur-

## 5 Ergebnisse

bekanntes Verhalten<sup>36,45</sup>, da er im Lichtzustand als Dimer mit einer Molekularmasse von 46,9 kDa eluiert (**Abbildung 15 A, Tabelle 21**), wohingegen er im Dunkelnzustand als Monomer mit einer Molekularmasse von 27,3 kDa eluiert (**Abbildung 15 A, Tabelle 21**). Allerdings liegt neben der prominenten monomeren Spezies noch eine kleine Menge dimerer Spezies ( $\sim 20\%$ ) im Dunkelnzustand des Wildtyps vor. Im Lichtzustand liegt neben dem prominenten Dimer noch eine heterogene Form vor. Diese liegt zwischen der Dimeren- und Monomeren-Form und zeigt, dass die Dimerisierung auf einen dynamischen Verhältnis beruht (**Abbildung 15 A**).



**Abbildung 15:** Charakterisierung der AuLOV-Mutanten mittels analytischer SEC (Superdex 75 30/10 *Increase*;  $P_{\text{Max}}$ : 2,8 MPa, Fluss: 0,5 ml/min, Menge: 500  $\mu$ l) zur Bestimmung des Lichtzustandes nach Beleuchtung mit Blaulicht (455 nm,  $7,6 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) und Dunkelnzustandes in Dunkelheit. Die Konzentration aller Proben betrug 1 mg/ml. **A:** Der AuLOV-Wildtyp eluiert im Lichtzustand hauptsächlich als Dimer und in Dunkelheit als Monomer. **B:** AuLOV<sup>V254M</sup> eluiert im Lichtzustand als Monomer und als Dimer im Dunkelnzustand. **C:** AuLOV<sup>V349W</sup> eluiert im Lichtzustand und im Dunkelnzustand als Dimer. **D:** AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> eluiert im Lichtzustand sowie im Dunkelnzustand als Dimer.

Die AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante eluiert ähnlich dem Wildtyp im Lichtzustand als Dimer und im Dunkelnzustand als Monomer, wobei auch hier im Dunkelnzustand eine kleine Menge dimerer Spezies zu erkennen ist (**Abbildung 15 B**). Jedoch zeigt die AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante ein prominenteres Dimer

## 5 Ergebnisse

im Lichtzustand als auch ein prominentes Monomer im Dunkelnzustand. Die Molekularmasse im Lichtzustand und Dunkelnzustand beträgt jeweils 48,6 kDa und 28,3 kDa (**Tabelle 21**). Interessanterweise zeigt die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante in beiden Beleuchtungszuständen eindeutig ein Dimer (**Abbildung 15 C, Tabelle 21**) mit apparenten Molekularmassen von 46,9 kDa und 48,3 kDa (**Tabelle 21**). Die Doppelmutante AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> zeigt ein von der V349W Mutation dominiertes Verhalten und liegt auch im Licht- und Dunkelnzustand als Dimer vor (**Abbildung 15 D**). Die Molekularmasse des Lichtzustandes beträgt 50,4 kDa und die des Dunkelnzustandes 46,3 kDa (**Tabelle 21**).

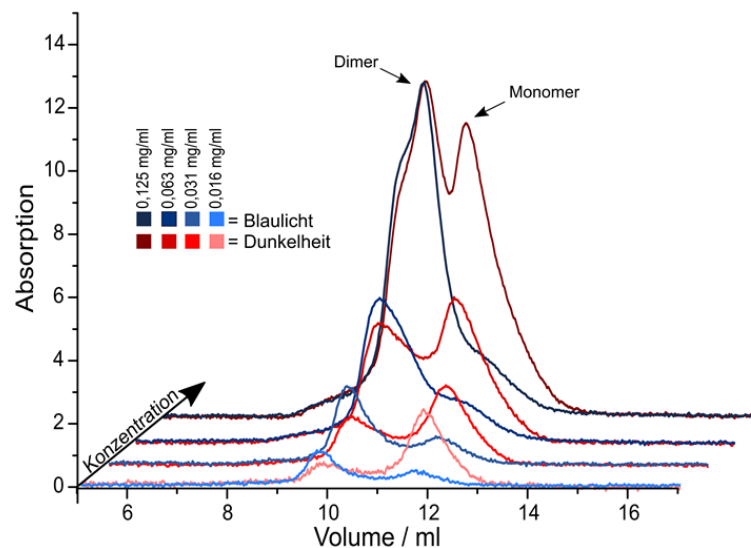
**Tabelle 21:** Elutionsvolumen und Molekularmasse der AuLOV-Mutanten in den analytischen SEC Experimenten. Die Molekularmasse wurde mit der Kalibrationsgerade aus **Abbildung 39** bestimmt.

Mutante	Elutionsvolumen / ml	Molekularmasse/ kDa	Molekularer Zustand
AuLOV <sup>WT</sup> Lichtzustand	10,4	46,9	Dimer
AuLOV <sup>WT</sup> Dunkelnzustand	11,9	27,3	Monomer
AuLOV <sup>V254M</sup> Lichtzustand	10,3	48,6	Dimer
AuLOV <sup>V254M</sup> Dunkelnzustand	11,8	28,3	Monomer
AuLOV <sup>V349W</sup> Lichtzustand	10,3	48,6	Dimer
AuLOV <sup>V349W</sup> Dunkelnzustand	10,4	46,9	Dimer
AuLOV <sup>V254M/V349W</sup> Lichtzustand	10,2	50,4	Dimer
AuLOV <sup>V254M/V349W</sup> Dunkelnzustand	10,4	46,9	Dimer

Basierend auf diesen Ergebnissen lassen sich die Mutanten in zwei Gruppen einteilen. Erstens die wildtypähnliche Gruppe mit dem AuLOV-Wildtyp und der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante, die ähnliches Schaltverhalten zeigen; hier sind sowohl der Dunkel- als auch der Lichtzustand heterogen und ein dynamisches Verhältnis liegt bei der Ausbildung des Dimers vor. Zweitens die AuLOV<sup>V349W</sup> dominierte Gruppe mit der AuLOV<sup>V349W</sup>- und AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante, die in beiden Beleuchtungszuständen ein homogenes Dimer zeigen. Basierend auf der entwickelten optogenetischen Anwendung mit der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante, stellt sich die Frage nach dem molekularen Zustand bei physiologisch relevanter Konzentration unter 1 mg/ml. Entsprechend wurden analytisch SEC Experimente mit Verdünnungsreihen der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante im

## 5 Ergebnisse

Licht- und Dunkelzustand durchgeführt. Bereits bei der höchsten Konzentration der Verdünnungsreihe (0,125 mg/ml) zeigt die AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante im Dunkelzustand eine Aufspaltung in den monomeren und dimeren Zustand (**Abbildung 16**), wobei der monomere Zustand mit 57 % dominiert (**Anhang Tabelle 29**). Ab einer Konzentration von 0,063 mg/ml nimmt im Dunkelzustand die monomere Spezies zu (**Abbildung 16**). In der zweit höchsten Konzentration ist mit 51 % knapp die monomere Spezies dominierend; diese Dominanz nimmt bis zu 70 % bei Konzentration von 0,016 mg/ml zu (**Abbildung 16, Anhang Tabelle 29**). Im Lichtzustand nach Blaulichtbeleuchtung ist jede Konzentration durch den dimeren Zustand dominiert (**Abbildung 16**). In der höchsten Konzentration beträgt der Dimeranteil 100% (**Anhang Tabelle 29**). Der Dimeranteil sinkt im Lichtzustand mit sinkender Konzentration auf 67 % ab (**Abbildung 16, Anhang Tabelle 29**). Durch die Verdünnungsreihen konnte gezeigt werden, dass die dimere AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante bei niedriger Konzentration in den monomeren Zustand übergeht und ein wildtypartiges Verhalten zeigt. Bei der niedrigsten Konzentration (0,016 mg/ml) lässt sich sowohl im Licht- als auch im Dunkelzustand ein Gleichgewicht zwischen monomeren und dimeren Zustand erkennen. In diesem Gleichgewicht hat die dominierende Spezies jeweils einen Anteil von 70%.



**Abbildung 16:** Exemplarische analytische SEC-Chromatogramme der Verdünnungsreihen der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante im Licht- und Dunkelzustand (Superdex 75 30/10 *Increase*;  $P_{\text{Max}}$ : 2,8 MPa, Fluss: 0,5 ml/min, Menge: 500  $\mu$ l). Mit abnehmender Konzentration nimmt die monomere Spezies im Dunkelzustand zu. Der Lichtzustand (Blaulich, 455 nm, 7,6  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) ist weiterhin durch die dimere Spezies dominiert. In Tabelle 29 ist die Quantifizierung der Triplikate gelistet.



### 5.1.3 UV/VIS spektroskopische Charakterisierung der AuLOV-Mutanten

Die Charakterisierung mittels UV/VIS Spektroskopie wurde genutzt, um Informationen über die Kinetik zur Ausbildung des C4(a)-Addukts und dessen Zerfall zu gewinnen sowie zur Bestimmung des FMN-Besetzungsgrades. Anhand der Dunkelspektren wurde der mittlere FMN-Besetzungsgrad der AuLOV-Mutanten nach *Banerjee et al* bestimmt.<sup>36</sup> Dazu wurde das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von FMN bei 447 nm und 280 nm bestimmt Gleichung (2). Es wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) verwendet:  $\text{FMN}_{447 \text{ nm}}^{111} = 12500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\text{FMN}_{280 \text{ nm}}^{36} = 18500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

$$\frac{\epsilon_{280 \text{ nm}}^{\text{FMN}}}{\epsilon_{447 \text{ nm}}^{\text{FMN}}} = 1,48 \quad (2)$$

Anschließend wurde die Absorption des FMNs bei 280 nm bestimmt. Die Konzentration des FMNs bei 447 nm und 280 nm wurden über das LAMBERT BEER'SCHE Gesetz (3)<sup>112</sup> bestimmt und addiert ( $\text{FMN}_{\text{Ges.}}$ ).

$$A = c \cdot \epsilon \cdot d \leftrightarrow c = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad (3)$$

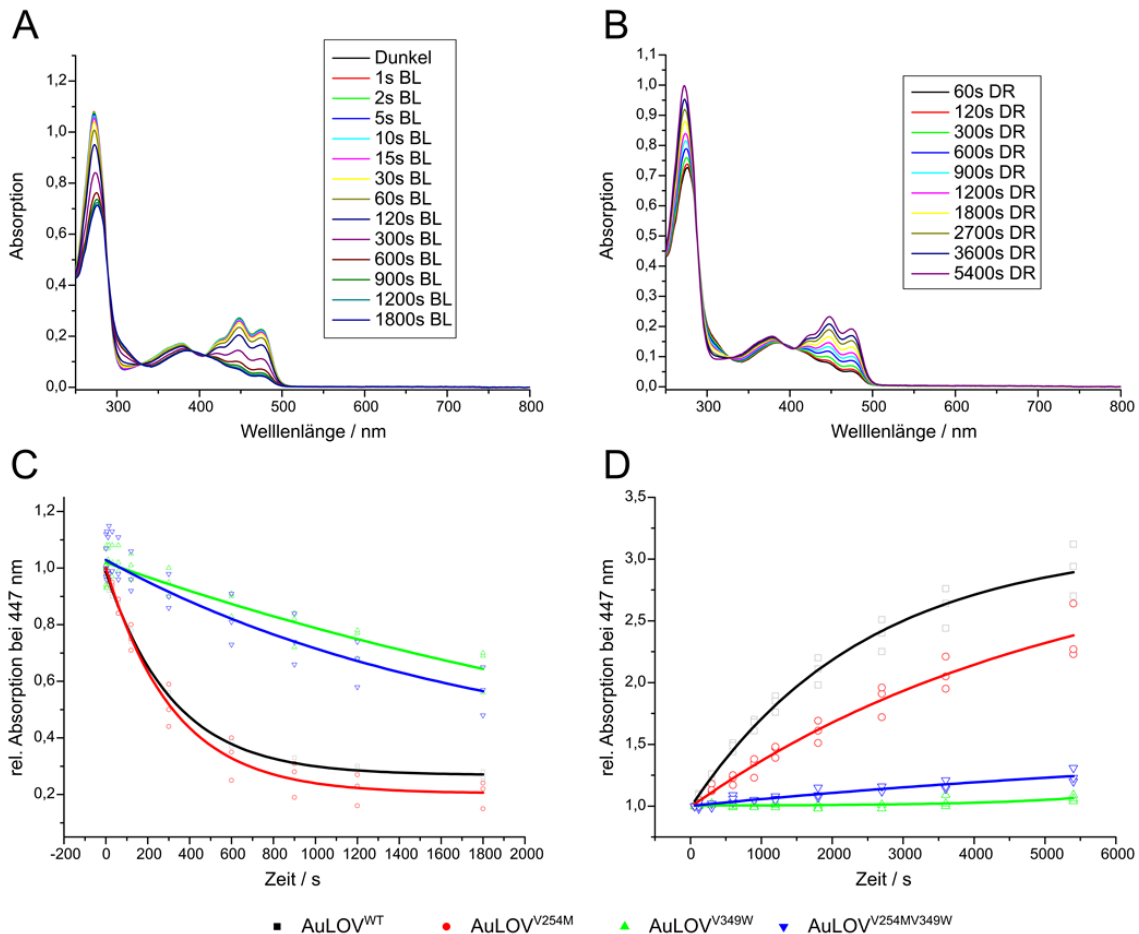
A = Absorption, c = Konzentration,  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient, d = Durchmesser der Küvette

Der Besetzungsgrad wurde über die Gleichung (4) bestimmt.

$$\text{FMN}_{\text{Besetzungsgrad}} = \frac{c_{\text{Ges.}}^{\text{FMN}}}{c_{\text{Protein}}} \quad (4)$$

Der berechnete Besetzungsgrad für Wildtyp und die AuLOV-Mutanten liegt zwischen 61 und 78 % (**Tabelle 22**) und damit über den Literaturwerten von *Herman* und *Kottke*, die zwischen 20 und 30 % angegeben sind.<sup>45</sup> Zur Beschreibung des Photoschaltverhaltens sind die Spektren der Blaulichtbeleuchtung des AuLOV-Wildtyps exemplarisch gezeigt (**Abbildung 17 A**). Die Bildung des C4(a)-Addukts lässt sich durch die Verringerung des Absorptionsmaximums des freien FMNs bei 447 nm erkennen (**Abbildung 17 A**). Bei 390 nm nimmt das charakteristische Maximum des Thioethers (C4(a)-Addukt) zu (**Abbildung 17 A**), sodass sich das Maximum von 447 nm zu 390 nm verschiebt. Für die Dunkelreversion lässt sich der gegenteilige Verlauf beobachten. Die Absorption bei 390 nm nimmt ab und das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu dem des freien FMNs bei 447 nm (**Abbildung 17 B**). In den Spektren lassen sich isosbestische Punkte erkennen, welche das Resultat der Ausbildung des C4(a)-Addukts (**Abbildung 17 A**) oder dessen Zerfalls sind (**Abbildung**

17 B). Isosbestische Punkte geben an, dass entweder zwei Spezies in einem Gleichgewicht zueinander stehen oder, dass eine Reaktion zwischen zwei Spezies abläuft, welche zwar über ein Intermediat verläuft, allerdings aufgrund der Kinetik, ohne Akkumulation desselben.<sup>113</sup> Die anderen Mutanten zeigen auch unter Blaulichtbeleuchtung die Ausbildung des C4(a)-Addukts (**Anhang Abbildung 49**). In der Dunkelreversion lässt sich der Zerfall des C4(a)-Addukts bei der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante und der Doppelmutante beobachten (**Anhang Abbildung 49 B, C**). Die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante zeigt nach 90 min noch keinen Zerfall (**Anhang Abbildung 49 D**).



**Abbildung 17:** Spektroskopische Untersuchungen der AuLOV-Mutanten und des Wildtyps. **A:** Exemplarische Spektren des AuLOV Wildtyps unter Blaulicht (455 nm,  $7,6 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Mit längerer Blaulichtbeleuchtung bildet sich der charakteristische Peak des C4(a)-Addukts bei 390 nm aus und der charakteristische Peak des ungebundenen FMNs bei 447 nm nimmt ab. **B:** Exemplarische Spektren des AuLOV Wildtyps in Dunkelheit. Die Dunkelreversion (DR) zeigt eine Abnahme des charakteristischen Maximums des C4(a)-Addukts bei 390 nm und eine Zunahme des charakteristischen Maximums des ungebundenen FMNs bei 447 nm mit der Zeit. **C:** Kinetische Auftragung zur Bestimmung der Halbwertszeiten für die Ausbildung des C4(a)-Addukts unter Blaulicht (455 nm,  $7,6 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) der AuLOV-Mutanten. **D:** Kinetische Graphen zur Bestimmung der Halbwertszeiten für den Zerfall des C4(a)-Addukts der AuLOV-Mutanten unter Lichtausschluss.

Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurde die mittlere Absorption bei 447 nm für die Blaulichtbeleuchtung und die Dunkelreversion gegen die Zeit aufgetragen und eine Funktion

## 5 Ergebnisse

exponentiellen Zerfalls erster Ordnung durch die Messpunkte gelegt (**Abbildung 17 C, D**). Die Halbwertszeit wurde mit der Gleichung (3) bestimmt.

$$t_{1/2} = \ln(2) * t_1 \quad (3)$$

Der AuLOV-Wildtyp und die AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante bilden den Thioether unter Blaulicht schneller als die Mutanten aus (**Abbildung 17 C, Tabelle 22**). Dahingegen zeigen die Mutanten AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> ein ähnliches Verhalten unter Blaulicht und sind um das sechs- bzw. elf-fache langsamer als der Wildtyp (**Abbildung 17 C, Tabelle 22**).

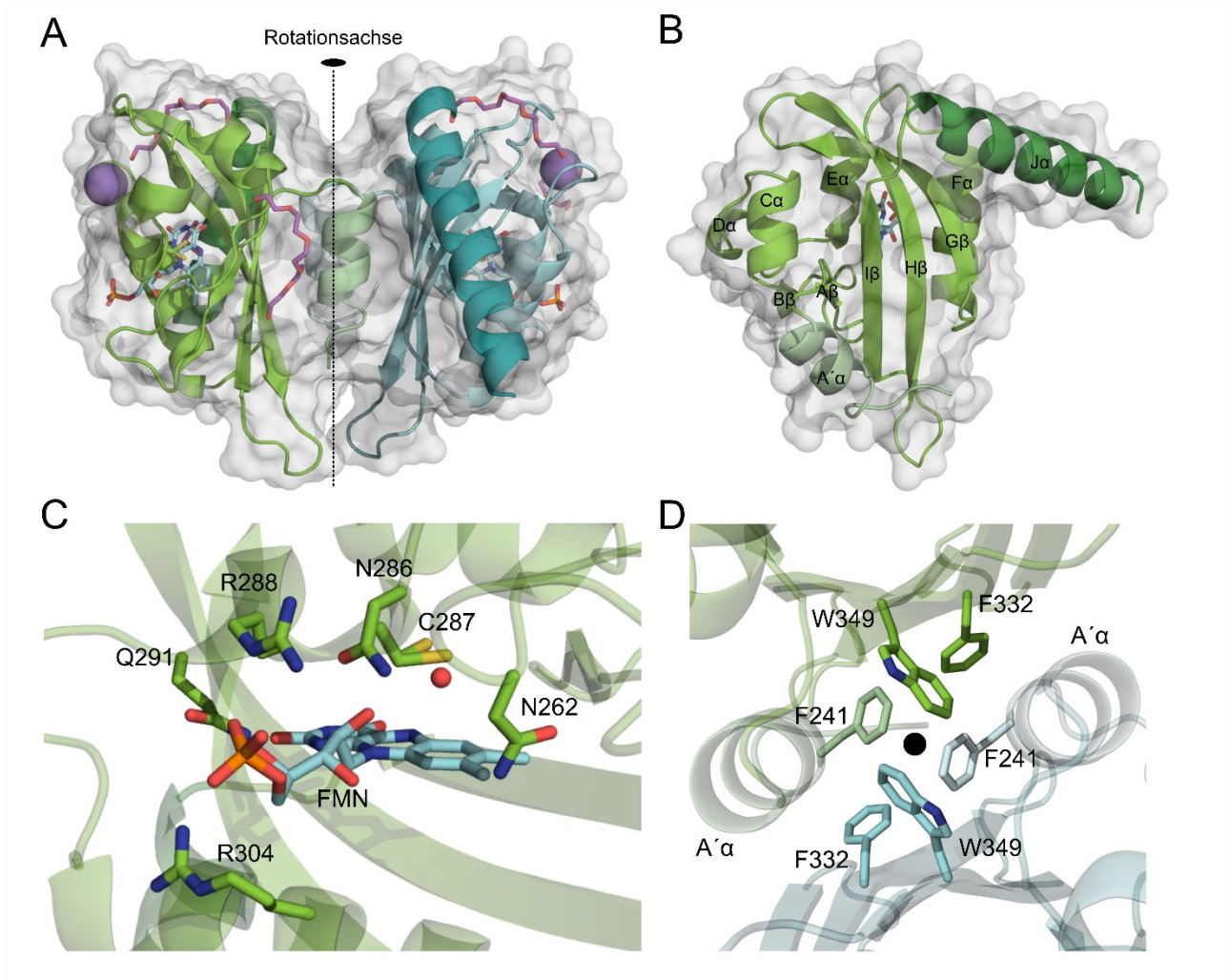
**Tabelle 22:** Halbwertszeiten der AuLOV-Mutanten und der FMN-Besetzungsgrad, berechnet aus den Dunkelspektren.

		Halbwertszeit $t_{1/2} / \cdot 10^3$ s	FMN-Besetzungsgrad in %
Blaulichtbeleuchtung	AuLOV <sup>WT</sup>	0,22 +/- 0,004	78 +/- 4
	AuLOV <sup>V254M</sup>	0,22 +/- 0,005	69 +/- 20
	AuLOV <sup>V349W</sup>	2,52 +/- 1,39	61 +/- 10
	AuLOV <sup>V254M/V349W</sup>	1,24 +/- 0,24	63 +/- 9
Dunkelreversion	AuLOV <sup>WT</sup>	1,70 +/- 0,09	
	AuLOV <sup>V254M</sup>	3,66 +/- 0,32	
	AuLOV <sup>V349W</sup>	> 20	
	AuLOV <sup>V254M/V349W</sup>	> 50	

Das C4(a)-Addukt des Wildtyps zerfällt in Dunkelheit am schnellsten, gefolgt von der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante, in der das C4(a)-Addukt im Vergleich zum Wildtyp etwa halb so schnell zerfällt (**Abbildung 17 D, Tabelle 22**). Für die Doppelmutante als auch für die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante konnten nur abgeschätzte Halbwertszeiten für den Zerfall angegeben werden (**Abbildung 17 D, Abbildung 17 D, Tabelle 22**), da die Dunkelreversion anscheinend sehr langsam, d.h.  $t_{1/2} > 20 \cdot 10^3$  s, von staten geht. Anhand der spektroskopischen Daten lassen sich die Mutanten in zwei Gruppen einteilen. Einmal gibt es die Gruppe mit dem AuLOV-Wildtyp und der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante die beide eine schnelle Ausbildung des C4(a)-Addukts und einen zügigen Zerfall zeigen. Dahingegen zeigt die Gruppe mit der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante und der Doppelmutante eine langsame Ausbildung des Thioethers und einen langsamen bis hin zu einem in diesem Aufbau nicht detektierbaren Zerfall des selbigen.

#### 5.1.4 Strukturelle Charakterisierung der AuLOV Dimerisierungsfläche

Aufgrund des sehr divergenten Verhaltens der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante im Vergleich zum Wildtyp wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt. Erste Kristalle und strukturelle Informationen wurden schon während der vorangegangenen Masterarbeit erhalten. Ziel in dieser Arbeit war es, diese zu verifizieren und die Auflösung zu verbessern. In den Kristallisationsexperimenten wurden nach einer Woche gelbe rhomboedrische Kristalle in Abwesenheit von Licht in 1,1 M Natriummalonat, 0,1 M HEPES pH 7, 0, 0,5 % Jeffamine ED-2003 erhalten und an der *Synchrotron Lichtquelle Schweiz* (SLS) in Villingen (Schweiz) vermessen. Für die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante wurde eine Auflösung von 1,9 Å erzielt und R<sub>work</sub>- und R<sub>free</sub>-Werte von 15,4 und 17,5 % nach der Verfeinerung erreicht; alle weiteren Parameter sind in Tabelle 23 gelistet. Nach der Beleuchtung der Kristalle mit Blaulicht (455 nm) lösten sich diese auf, so dass keine Struktur des Lichtzustandes erhalten werden konnte. Die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante kristallisiert mit zwei Molekülen pro asymmetrische Einheitszelle (**Abbildung 18 A**). Zusätzlich wurden in der asymmetrischen Einheitszelle zwei Natriumionen, drei Fragmente des Jeffamins ED-2003, zwei Glycerinmoleküle und ein Malonatmolekül gefunden (**Abbildung 18 A**); dabei handelt es sich um Bestandteile der Kristallisationsbedingung. Die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante zeigt eine Dimerstruktur bestehend aus zwei Ketten A und B, welche eine Rotationsachse mit C2-Symmetrie besitzen (**Abbildung 18 A**). Die charakteristischen Sekundärstrukturelemente (A'α-Aβ-Bβ-Cα-Dα-Eα-Fα-Gβ-Hβ-Iβ-Jα) der AuLOV-Domäne, die von *Banerjee et al* beschrieben wurden<sup>36</sup>, konnten den Ketten der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante zugeordnet werden (**Abbildung 18 B**). Das konservierte PAS-Faltungsmotiv besteht aus fünf antiparallelen β-Stränge (Aβ, V253-T255; Bβ, V265-A267; Gβ, M313-R321; Hβ, G324-337 und Iβ, T344-K352), und vier Helices (Cα, Q269-T275; Dα, L279-I282; Eα, N286-291; Fα, P298-Q309). Die beiden Helices A'α (F241-A248) und Jα (D355-N374) flankieren das PAS-Faltungsmotiv (**Abbildung 18 B**). Aufgrund von intrinsischer Unordnung am C-Terminus konnten die letzten beiden Aminosäuren nicht aufgelöst werden. Der Flavin-Cofaktor (FMN) ist in der Cofaktortasche über Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken durch die von *Banerjee et al* beschriebenen Reste N262, N286, R288, Q291 und R304 gebunden sowie ein für die Bindung relevantes Wasser (**Abbildung 18 C**).<sup>36</sup> Cystein 287, welches für die Ausbildung des Thioethers mit dem FMN relevant ist und in der Eα-Helix sitzt, zeigt zudem eine alternative Konformation und weist wie erwartet für den Dunkelzustand keine kovalente Bindung zum C4(a)-Atom des Isoalloxazin-Rings auf (**Abbildung 18 C**). Die Dimerisierungsfläche ist von einem hydrophoben Kern dominiert, durch den die C2-Symmetrieachse verläuft (**Abbildung 18 D**).



**Abbildung 18:** Strukturelle Elemente des Dimers des Dunkelzustandes der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante. **A:** Das Dimer des Dunkelzustandes der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante besteht aus zwei Ketten (Kette A = grün, Kette B = blau). Die A'- $\alpha$ -Helix ist in hellerem und die J $\alpha$ -Helix in dunklerem Ton dargestellt. Durch die Mitte des Dimers verläuft eine Rotationsachse mit einer C2-Symmetrie. Die asymmetrische Einheitszelle enthält zwei Moleküle der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante, zwei Natriumionen, drei Fragmente des Jeffamins ED-2003, zwei Glycerinmoleküle sowie eine Malonatmolekül. **B:** Die Sekundärstrukturelemente, die von Banerjee et al. beschrieben wurden<sup>36</sup>, sind in der dimeren Struktur des Dunkelzustandes der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante vorhanden. Insgesamt enthält eine Kette sechs  $\alpha$ -Helices und fünf  $\beta$ -Stränge. **C:** Der FMN-Cofaktor (cyan) ist in seiner Cofaktortasche durch die Reste N262, N286, R288, Q291 und R304 (grüne Stäbe) gebunden. Das in die FMN-Bindung involvierte Wasser ist als rote Kugel dargestellt. Das Cystein 287 zeigt eine alternative Konformation, aber keine Bindung zum FMN im Dunkelzustand. **D:** Die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante zeigt eine neue Anordnung der Dimerisierungsfläche, welche von einem hydrophoben Kern dominiert ist. Dieser Kern ist aus den Resten F241, F332 und W349 aufgebaut, durch den Rest F241 ist die A'- $\alpha$ -Helix in die Dimerisierungsfläche eingebunden. Die Rotationsachse verläuft genau durch den hydrophoben Kern.

Dieser hydrophobe Kern besteht aus den drei Resten (**Abbildung 18 D**), F241 (A'- $\alpha$ -Helix), F332 (H $\beta$ -Strang) und W349 (I $\beta$ -Strang). Durch das Phenylalanin 241 zeigt die A'- $\alpha$ -Helix eine stärkere Involvierung in die Dimerisierungsfläche als in den beiden vorherigen Dunkelstrukturen (5dkk und 5a8b) der AuLOV-Domäne.<sup>36,48</sup> In beiden Dunkelstrukturen (5dkk und 5a8b) liegt die A'- $\alpha$ -Helix von

## 5 Ergebnisse

außen an dem PAS-Faltungsmotiv an. Nur zwei Reste aus dem hydrophoben Kern sind involviert, F241 (A'  $\alpha$ -Helix) und F332 (H $\beta$ -Faltblatt).<sup>36,48</sup>

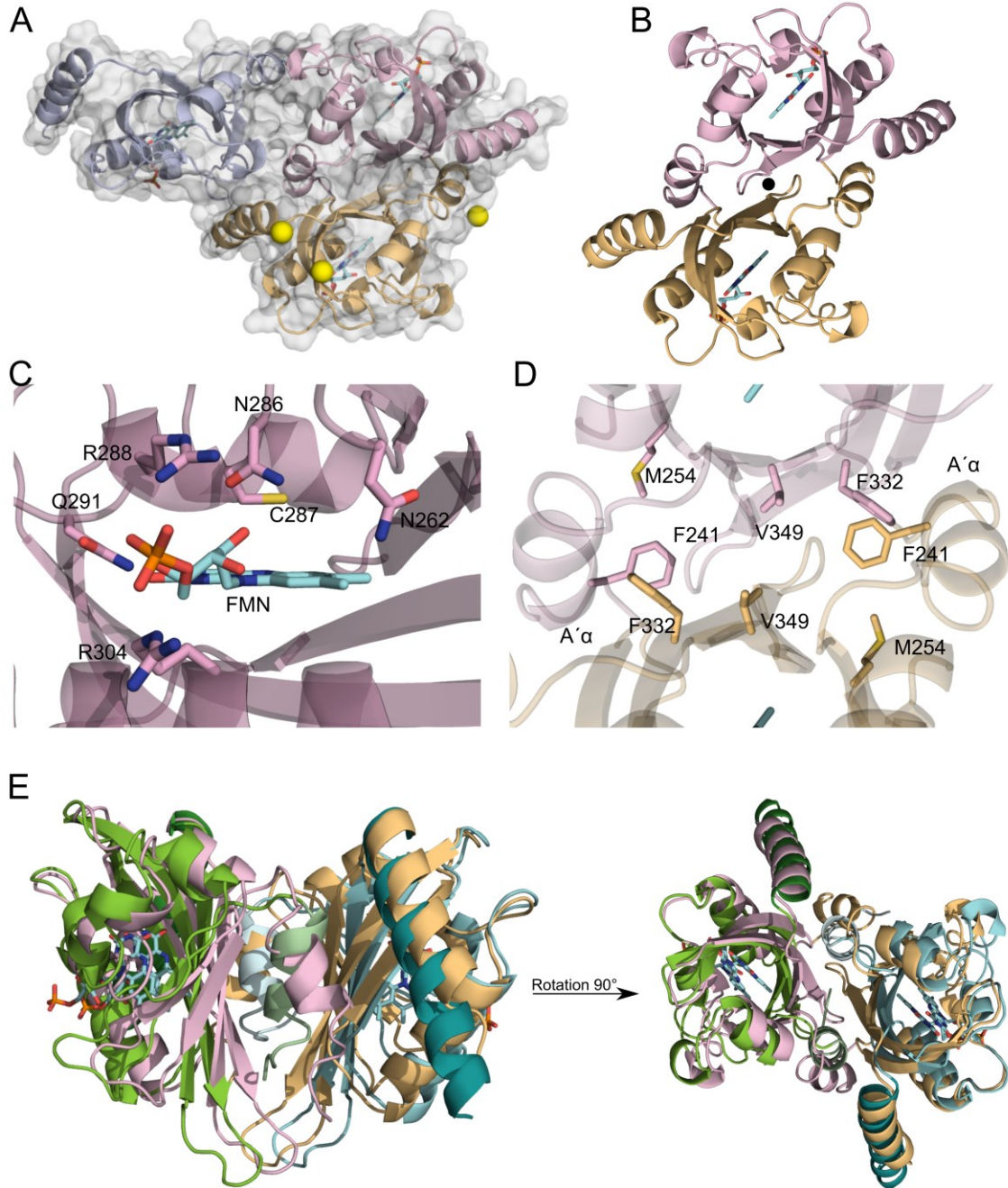
**Tabelle 23:** Statiken der Datensammlung und der Verfeinerung der Strukturen der AuLOV<sup>W349</sup>- und AuLOV<sup>M254</sup>-Mutante.

Datensammlung	AuLOV <sup>V349W</sup>	AuLOV <sup>V254M</sup>
Röntgenquelle	SLS, PXI-X06SA	SLS, PXI-X06SA
Raumgruppe	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 6 <sub>5</sub> 2 2
Zellmaße (Å / °)	a = 100,75, b = 100,75, c = 120,57 / $\alpha$ = 90, $\beta$ = 90, $\gamma$ = 90	a = 168,37, b = 168,37, c = 95,71 / $\alpha$ = 90, $\beta$ = 90, $\gamma$ = 120
Wellenlänge (Å)	1,00	1,00
Auflösung (Å)	46,5-1,90	48,6 – 3,44
Vollständigkeit (%)	99,96 / 100,0	98,85 / 90,80
Reflexe	98946	22010
Einzigartige Reflexe	49476	11046
Multiplizität	2,0 / 2,0	2,0 / 2,0
Wilson B Faktor (Å <sup>2</sup> )	38,84	107,3
Mittleres I/ $\sigma$	24,51 / 2,39	8,36 / 1,29
Verfeinerungsstatistik		
Auflösung (Å)	1,968-1,90	3,56- 3,44
R <sub>work</sub> (%) / R <sub>free</sub> (%)	15,38 / 17,48	24,97 / 27,84
Durchschnittlicher B Faktor (Å <sup>2</sup> )	49,82	115,5
Anzahl der Atome	2718	3232
r.m.s.d Bindungslängen (Å)	0,024	0,002
r.m.s.d Bindungswinkel ( °C)	1,82	0,48

## 5 Ergebnisse

Der Abstand zwischen den C-Termini beträgt im Dimer des Dunkelzustandes der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante 56,9 Å sowie 15,9 Å zwischen den N-Termini. Der Abstand der C-Termini in der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante unterscheidet sich damit erheblich von dem der AuLOV-Domäne im Dunkelzustand; hier sind es 18,7 Å.<sup>36</sup> Dagegen ist der Abstand zwischen den N-Termini in der AuLOV-Domäne im Dunkelzustand mit 14,9 Å sehr ähnlich ist.<sup>36</sup> Gelbe hexagonale Kristalle der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante wurden in 0,1 M HEPES pH 7,5, 0,8 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,8 M H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> in der Abwesenheit von Licht nach circa sechs Monaten erhalten und am SLS (*Villingen, Schweiz*) vermessen. Die Auflösung der Struktur beträgt 3,4 Å, die R<sub>work</sub>- und R<sub>free</sub>-Werte betragen 24,97 und 27,84 % nach der Verfeinerung. Alle anderen statistischen Parameter sind in Tabelle 23 gelistet. In der asymmetrischen Einheitszelle wurden drei Moleküle der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante und drei Chloridionen gefunden (**Abbildung 19 A**). Wie die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante geht auch durch das Dimer der AuLOV<sup>V254M</sup> Mutante eine Rotationsachse mit C<sub>2</sub>-Symmetrie (**Abbildung 19 B**). Der FMN Cofaktor ist auf dieselbe Art und Weise wie in der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante durch die von *Banerjee et al.* beschriebenen Reste N262, N286, R288, Q291 und R304 gebunden (**Abbildung 19 C**).<sup>36</sup> Das Cystein 287 zeigt keine Ausbildung des C4(a)-Addukts wie für den Dunkelzustand erwartet (**Abbildung 19 C**). Die Dimerisierungsfläche zeigt eine sehr ähnliche Anordnung wie die der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante mit der Involvierung der Reste F241 (A'α-Helix), F332 (Hβ-Strang) und V349 (Iβ-Strang) (**Abbildung 19 D**). Das Methionin M254 (Aβ-Faltblatt) stabilisiert diese Packung (**Abbildung 19 D**). Alle Sekundärstrukturelemente, die in der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante gefunden wurden, sind auch in der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante vorhanden (**Abbildung 19 E**). Durch Superposition der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante mit der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante lässt sich eine ähnliche Dimeranordnung erkennen (**Abbildung 19 E**). Sowohl die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante als auch die AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante zeigen im Dunkelzustand eine Dimeranordnung, die sich von stark von der des AuLOV-Wildtyps im Dunkelzustand, sowie von der Struktur des Lichtzustands unterscheiden. Dies spricht für eine konformationelle Heterogenität der Dimerisierungsfläche der AuLOV-Domäne. Eine Analyse der Dimeranordnungen in der AuLOV-Domäne zeigt, dass in der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante wie auch in der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante die A'α-Helices stark in die Dimerisierungsfläche eingebunden sind (**Abbildung 20**). Die Jα-Helices flankieren das Dimer (**Abbildung 20**). Beide Strukturen wurden der PDB-Datenbank hinterlegt: AuLOV<sup>M254</sup> = PDB: 6t73; AuLOV<sup>W349</sup> = PDB: 6t74.



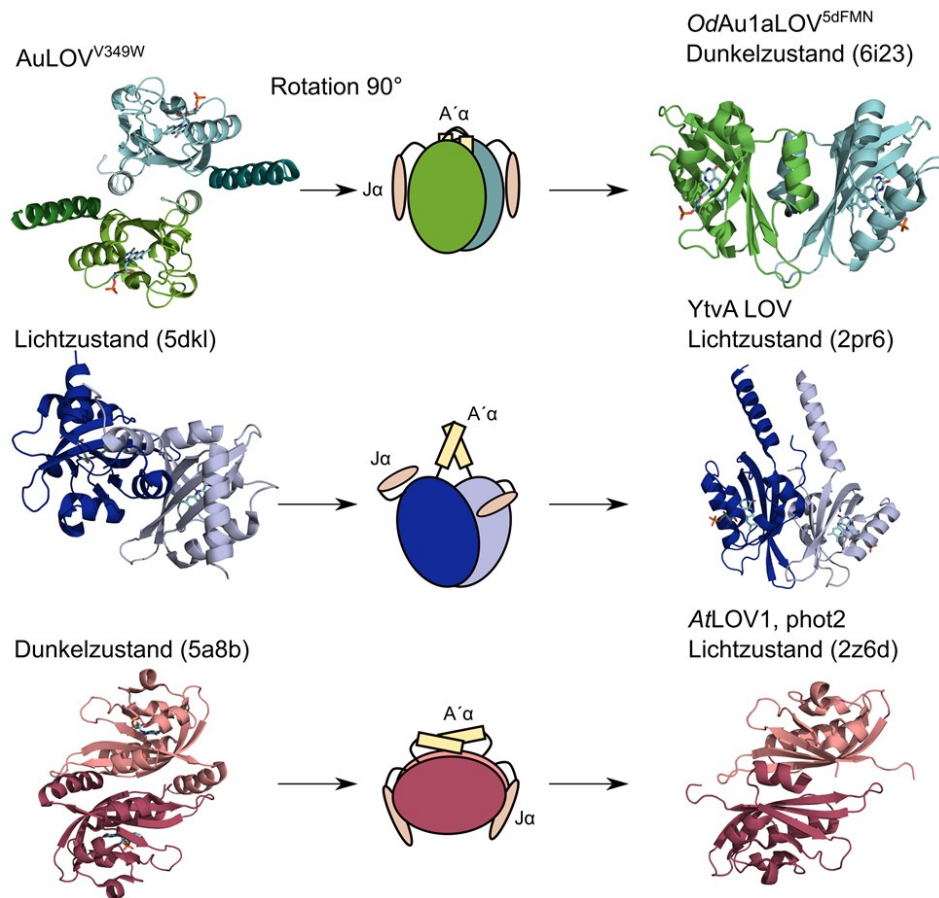


**Abbildung 19:** Strukturelle Analyse der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante. **A:** Struktur der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante. Drei Moleküle wurden pro asymmetrische Einheitszelle gefunden, zusätzlich wurde 3 Chloridionen gefunden. (Kette A = pink, Kette B = sandfarben, C = blau.) **B:** Das Dimer aus Kette A und B enthält eine Rotationsachse mit C2-Symmetrie. **C:** Der FMN Cofaktor ist in der Cofaktortasche gebunden und alle Reste konnten identifiziert werden wie die von *Banerjee et al.* beschrieben.<sup>36</sup> **D:** In der Dimerisierungsfläche sind dieselben Reste wie in der AuLOV<sup>V2349W</sup>-Mutante involviert (V349 = W349). **E:** Superposition der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante (Kette A = grün, Kette B = Cyan) und AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante (Kette A = pink, Kette B = sandfarben) zeigen eine ähnliche Dimeranordnung und alle Strukturelemente aus der AuLOV<sup>V2349W</sup>-Mutante wurden in der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante gefunden.

Ein Datenbankabgleich<sup>108</sup> hat ergeben, dass die Aureochrom 1a LOV-Domäne von *Ochromonas danica* eine ähnliche Dimeranordnung zeigt wie die beiden AuLOV-Mutanten (**Abbildung 20**).<sup>34</sup> Die Identität der Sekundärstrukturelemente beträgt 95 % für die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante und 91 % für die



AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante (**Abbildung 20, Tabelle 24**). Im Lichtzustand des AuLOV-Wildtyps kreuzen sich die A'- $\alpha$ -Helices und zeigen in die gleiche Richtung von der Dimerisierungsfläche weg, wohingegen sich die J $\alpha$ -Helices an das PAS-Faltungsmotiv anlagern und in entgegengesetzte Richtungen zeigen (**Abbildung 20**). Die bakterielle LOV-Domäne YtvA hat in ihren Licht- und Dunkelzustand eine Sekundärstrukturelementidentität von 75 % bzw. 80 % mit dem Lichtzustand der AuLOV-Domäne (**Abbildung 20, Tabelle 24**).<sup>34</sup> Im Dunkelzustand flankieren die Helices die Dimerisierungsfläche der AuLOV-Domäne, die J $\alpha$ -Helices zeigen in die gleiche Richtung während sie die Dimerisierungsfläche ummanteln (**Abbildung 20**). Dahingegen kreuzen sich die A'- $\alpha$ -Helices bei der Anlagerung an das PAS-Faltungsmotiv und zeigen in entgegengesetzte Richtungen (**Abbildung 20**).



**Abbildung 20:** Analyse der Dimeranordnungen in der AuLOV-Domäne. Die schematische Zeichnung zeigt die Anordnung der flankierenden Helices zum PAS-Faltungsmotiv. Die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante zeigt eine Involvierung der A'- $\alpha$ -Helices in die Dimerisierungsfläche während die J $\alpha$ -Helix diese flankiert. Im Lichtzustand (5dki) kreuzen sich die A'- $\alpha$ -Helices und zeigen in die gleiche Richtung von der Dimerisierungsfläche weg während die J $\alpha$ -Helices das PAS-Faltungsmotiv flankieren und in entgegengesetzte Richtungen zeigen. Im Dunkelzustand (5a8b) flankieren die Helices die Dimerisierungsfläche. Die J $\alpha$ -Helices zeigen in die gleiche Richtung. Die A'- $\alpha$ -Helices kreuzen sich bei der Anlagerung und zeigen in entgegengesetzte Richtungen. Die Literatursuche und PISA-Analyse lieferten für die beschriebenen Dimeranordnungen Beispiele von anderen LOV-Domänen.

## 5 Ergebnisse

Der Dunkelzustand der ersten LOV-Domäne aus dem Phototropin 1 und 2 aus *Arabidopsis thaliana* besitzt eine Sekundärstrukturelementidentität von 95 und 84 % mit dem Dunkelzustand der AuLOV-Domäne (**Tabelle 24**).<sup>114</sup> Von den heterogenen Dimerisierungsflächen der AuLOV-Domäne und ihren Analogen aus anderen LOV-Domänen wurde eine Analyse bezüglich der Größe der Dimerisierungsflächen und der Änderung der Gibbsenergie der Dimerisierungsflächen ( $\Delta^iG$ ) durch die Dimerisierung durchgeführt. Eine vorhergesagte negative Gibbsenergie geht mit hydrophoben Interaktionsflächen einher und mit einer Affinität der Interaktionspartner.<sup>109</sup> Thermodynamisch betrachtet handelt es sich um ein exergone Reaktion wenn,  $\Delta^iG$  Werte kleiner Null annehmen.<sup>115</sup> Ist  $\Delta^iG$  größer Null, ist die Reaktion thermodynamisch ungünstig.<sup>115</sup>

**Tabelle 24:** Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der Dimerstrukturen der AuLOV-Domänen und der Dimerisierungsflächen PISA-Server.<sup>109</sup> \* Übereinstimmung der Sekundärstrukturelemente.

Name	Zustand	PDB	Übereinstimmung * / %	Kette	Dimerisierungsfläche / $\Delta^iG$ / kcal/mol $\text{\AA}^2$
AuLOV	Licht	5dkl	100	A + B	1522,9 -27,2
YtvA LOV	Dunkel	2pr5	80	A + B	891,5 -13,6
YtvA LOV	Licht	2pr6	75	A + B	797,1 -10,0
AuLOV	Dunkel	5a8b	100	A + B	962,0 -9,4
		5a8b	100	C + D	894,1 -6,4
AuLOV	Dunkel	5dkk	100	A + B	775,7 -4,2
<i>At</i> LOV1 <sup>Phot1</sup>	Dunkel	2z6c	95	A + B	1063,4 -19,2
<i>At</i> LOV1 <sup>Phot2</sup>	Dunkel	2z6d	84	A + B	984,6 -22,5
AuLOV <sup>V349W</sup>	Dunkel		100	A + B	870,3 -11,3
<i>Od</i> LOV <sup>5dFMN</sup>	Dunkel	6i23	95	A + B	855,1 -12,3
AuLOV <sup>V254M</sup>	Dunkel		100	A + B	1437,3 -8,4
<i>Od</i> LOV <sup>5dFMN</sup>	Dunkel	6i23	91	A + B	855,1 -12,3

Ein Dimer bildet sich bevorzugter aus, je kleiner der  $\Delta^iG$ -Wert ist. Mit -27,2 kcal/mol ist der dimere Lichtzustand der AuLOV-Domäne das thermodynamisch bevorzugte Dimer und zeigt auch die größte Dimerisierungsfläche (**Tabelle 24**). Die analogen Kristallstrukturen der YtvA LOV-Domäne zeigen eine wesentlich kleinere Dimerisierungsfläche und auch eine höhere Gibbsenergie (**Tabelle 24**). Der Dunkelzustand der AuLOV-Domäne besitzt eine kleinere Dimerisierungsfläche und eine Änderung der Gibbsenergie zwischen -4,2 und -9,4 kcal/mol abhängig von der betrachteten Kristallstruktur (**Tabelle 24**). Die analogen Dunkelstrukturen der LOV-Domänen aus der dem Phototropin 1 und 2 aus *A. thaliana* besitzen eine ähnlich große Dimerisierungsfläche, aber eine niedrigere Gibbsenergie (**Tabelle 24**). Die neue Dimerisierungsfläche des Dunkelzustandes der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante beträgt 870,3 Å<sup>2</sup> und die Gibbsenergie liegt mit -11,3 kcal/mol über der des Dunkelzustandes des Wildtyps (**Tabelle 24**). Das analoge Dimer *OdLOV*<sup>5dFMN</sup> besitzt eine ähnlich große Dimerisierungsfläche sowie eine ähnliche Gibbsenergie (**Tabelle 24**). Die Dimerisierungsfläche des Dunkelzustandes der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante ist wesentlich größer als die des Dunkelzustandes der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante und in dem analogen Dimer *OdLOV*<sup>5dFMN</sup>. Die Gibbsenergie ist größer und entspricht etwa der des Dunkelzustandes des AuLOV-Wildtyps (**Tabelle 24**). Die Analyse der Dimerisierungsflächen und der Gibbsenergie zeigt, dass die neue Dimerisierungsfläche im Dunkelzustand der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante und der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante thermodynamisch etwas begünstigter ist als der Dunkelzustand des AuLOV-Wildtyps.

### 5.2 Reinigung und proteinchemische Charakterisierung eines *in vivo* Konstruktes

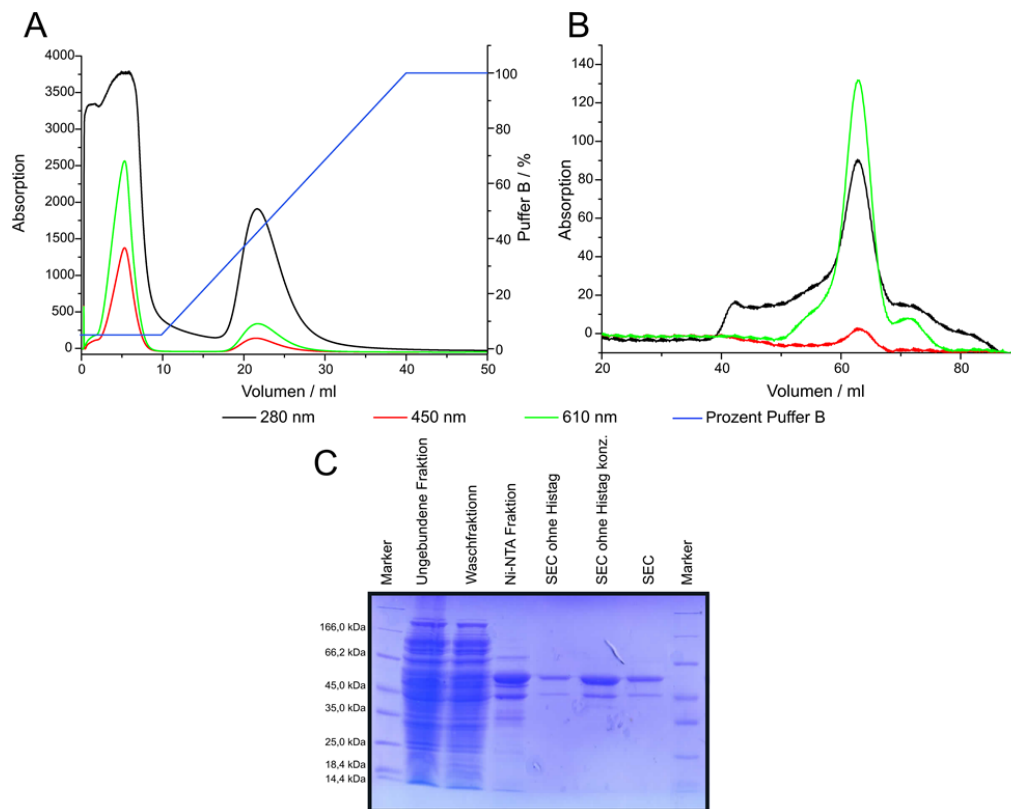
Bisher wurde nur die AuLOV-Domäne an sich betrachtet. Da diese *in vivo* als Fusionskonstrukt verwendet wird, wurde das initiale mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstrukt aus der vorangegangenen Masterarbeit überproduziert und gereinigt. Dieses besteht aus der AuLOV Wildtyp Domäne, welche C-terminal mit dem cODC1 Degron fusioniert ist und N-terminal über einen Myc-Tag als linker Sequenz mit eine mCherry verbunden ist (**Abbildung 21**).



**Abbildung 21:** Schematischer Aufbau des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes. Die AuLOV-Domäne (Wildtyp, gלב) ist C-terminal mit dem cODC1-Degron (grün) fusioniert. N-terminal ist die AuLOV-Domäne über einen 3myc-Tag (blau) mit dem mCherry (rot) fusioniert.

### 5.2.1. Reinigung des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes

Die Überproduktion des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes erfolgte in *E. coli*. Anschließend folgte die Reinigung, um das Konstrukt proteinbiochemisch zu charakterisieren. Der erste Aufreinigungsschritt war die IMAC. Hier eluierte das mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstrukt bei 40% Imidazol (100% = 500 mM) (**Abbildung 22 A**). Die Fraktionen des pinken Proteins wurden vereinigt und konzentriert und anschließend im zweiten Schritt mittels SEC gereinigt. Nach erneutem Konzentrieren wurde der His-tag durch einen Thrombinverdau über Nacht bei 4 °C entfernt. Nach dem Thrombinverdau erfolgte eine inverse IMAC, um den abgespaltenen His-tag und unverdaute Moleküle des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes zu entfernen.



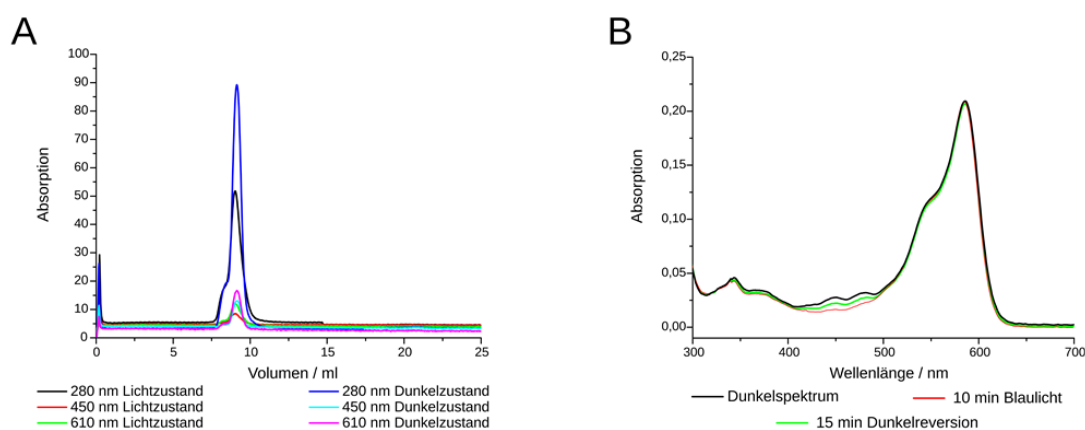
**Abbildung 22:** Reinigung des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes. **A:** IMAC. Das Konstrukt eluierte bei 40% Imidazol (100% = 500 mM). **B:** Chromatogramm der SEC-Chromatographie des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes ohne His-tag, das Elutionsvolumen liegt bei 62 ml. **C:** SDS-PAGE zur Kontrolle der Reinheit des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes. Alle Kontaminationen konnten entfernt werden. Die Größe des Konstruktes entspricht der erwarteten Molekularmasse von 50,7 kDa ohne His-tag und von 52,6 kDa mit His-tag. Eine Bande bei ~45 kDa konnte nicht abgetrennt werden, hier handelt es sich um ein Spaltprodukt vom mCherry, dies wurde per MS-Analyse überprüft.

Abschließend erfolgt die erneute SEC-Chromatographie, um das Thrombin von dem mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstrukte zu trennen; hier eluiert das Konstrukt bei 62,0 ml (**Abbildung 22 B**). Die Reinheit des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes wurde mit Hilfe eines SDS-PAGE

überprüft. Die Verunreinigungen nach der IMAC konnten mittels SEC abgetrennt werden (**Abbildung 22 C**). Eine Bande bei etwa 45 kDa konnte nicht abgetrennt werden (**Abbildung 22 C**), hierbei handelt es sich um ein Spaltprodukt des mCherries aufgrund der reduzierenden Bedingungen, dies wurde per MS-Analyse überprüft. Die Masse der Bande des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes entspricht den erwarteten Molekularmassen (**Abbildung 22 C**); 50,7 kDa für das Konstrukt ohne His-tag und 52,6 kDa für das Konstrukt mit His-tag. Aus einem Liter Expressionskultur wurden nach der ersten SEC 15,8 g Protein erhalten, nach der Entfernung des His-tags und der zweiten SEC wurden 4,8 g erhalten.

### 5.2.2 Charakterisierung des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes

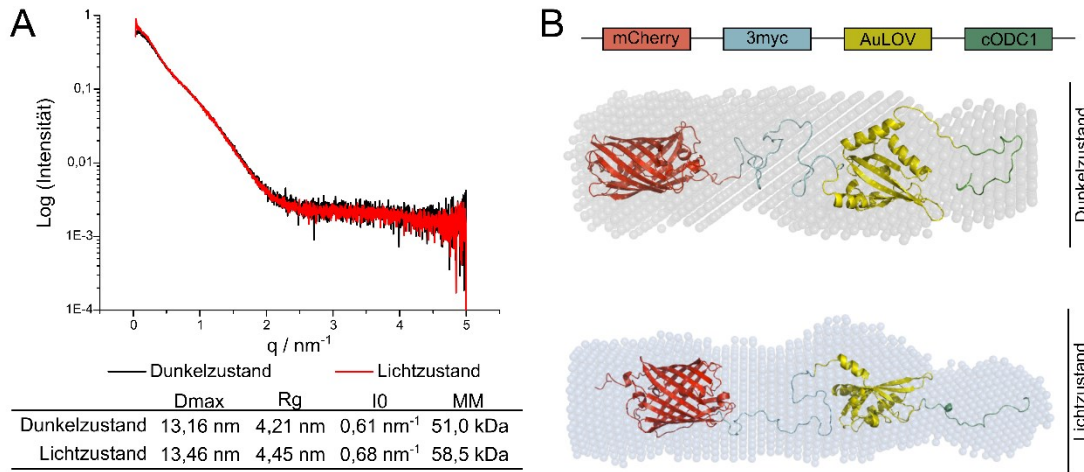
Im ersten Schritt der Charakterisierung wurden der oligomere Zustand und die Molekularmasse mittels analytischer SEC des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes mit His-tag abgeschätzt. Der Lichtzustand eluiert bei 9,2 ml (**Abbildung 23 A**); dies entspricht einer Molekularmasse von 72,0 kDa. Interessanterweise eluiert der Dunkelzustand bei 9,1 ml (**Abbildung 23 A**) mit einer Molekularmasse 75,4 kDa. Beide liegen dementsprechend in monomerer Form vor, obwohl beide Molekularmassen wesentlich über der erwarteten Masse von 52,6 kDa liegen. Dies lässt sich mit einer elongierten Form des Konstruktes erklären, da es nicht so tief in die Poren des Säulenmaterials eindringen kann, wie ein globuläres Protein und somit früher eluiert.



**Abbildung 23:** Charakterisierung des mCherry-AuLOV-cODC1 Konstruktes mit His-tag. **A:** Analytische SEC-Chromatographie des Licht- und Dunkelzustandes des mCherry-AuLOV-cODC1 Konstrukts mit His-tag. Das Elutionsvolumen des Lichtzustandes (455 nm,  $7,6 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) beträgt 9,2 ml und das des Dunkelzustandes 9,1 ml. **B:** UV/VIS Spektren des mCherry-AuLOV-cODC1 Konstrukts mit His-Tag. Die charakteristischen Absorptionsmaxima der AuLOV-Domäne lassen sich bei 390 nm und 447 nm erkennen. Durch die Bestrahlung mit Blaulicht (455 nm,  $7,6 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) kommt es zur Ausbildung des C4(a)-Addukts und zur Verringerung des Absorptionsmaximums bei 447 nm, welches sich nach Inkubation in Dunkelheit wieder ausbildet. Das charakteristische Absorptionsmaximum von mCherry bei 590 nm lässt sich in allen Spektren erkennen. Ein zweites Maximum von mCherry bei 410 nm wird von dem Spektrum der AuLOV überlagert.

Im nächsten Schritt wurde das mCherry-AuLOV-cODC1 Konstrukt UV/VIS spektroskopisch charakterisiert. Die charakteristischen Absorptionsmaxima der AuLOV-Domäne lassen sich bei 390 nm und 447 nm erkennen (**Abbildung 23 B**). mCherry zeigt sein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 590 nm (**Abbildung 23 B**).<sup>116</sup> Ein zweites Maximum von mCherry bei 410 nm<sup>116</sup> wird von dem Spektrum der AuLOV überlagert (**Abbildung 23 B**). Durch die Bestrahlung mit Blaulicht kommt es zur Ausbildung des C4(a)-Addukts und zur Verringerung des Absorptionsmaximums bei 447 nm und zur Zunahme des Maximums bei 390 nm. Anschließende Inkubation im Dunkeln führt wieder zum Zerfall des C4(a)-Addukts und das Maximum der AuLOV verschiebt sich von 390 nm zu 447 nm (**Abbildung 23 B**). Die Spektren zeigen eindeutig, dass es sich bei dem mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstrukt um ein photoaktives Protein handelt, die AuLOV-Domäne mittels Blaulichts in den Lichtzustand überführt werden kann und einen Photozyklus mit der Dunkelreversion durchläuft. Abschließend erfolgten SAXS-Messungen des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes ohne His-tag im Licht- und Dunkelzustand, um Informationen über die Form und Größe des Konstruktes zu ermitteln. Die Streukurven der beiden Zustände weisen keine signifikanten Unterschiede auf (**Abbildung 24 A**). Die Streukurven wurden aus Messungen bei verschiedenen Konzentrationen zusammengelegt, um den Strukturfaktor zu erhalten, der abhängig von der Konzentration ist.<sup>117</sup> Im Vergleich zum Formfaktor ist dieser gering zu halten.<sup>117</sup> Mit dem Programm ATSAS wurden folgenden Parameter aus den Streukurven ermittelt: die maximalen Dimension des Partikels (Dmax), der Streumassenradius (Rg), die Intensität der Vorwärtsstreuung (I0) und die Molekularmasse (MM) nach *Rambo et al.*<sup>117,118</sup> Für den Lichtzustand wurde ein etwas größerer Dmax-Wert mit 13,42 nm bestimmt als für den Dunkelzustand; hier liegt der Dmax-Wert bei 13,16 nm (**Abbildung 24 A**). Der Streumassenradius (Rg-Wert) gibt die allgemeine Größe des Partikels an.<sup>117</sup> Der Lichtzustand zeigt wie erwartet den größeren Rg-Wert von 4,45 nm; der Rg-Wert des Dunkelzustandes liegt bei 4,21 nm (**Abbildung 24 A**). Die Intensität der Vorwärtsstreuung ist für den Lichtzustand aufgrund des größeren Partikels mit einem I0-Wert von 0,68 nm<sup>-1</sup> intensiver als für den Dunkelzustand mit einem I0-Wert von 0,61 nm<sup>-1</sup> (**Abbildung 24 A**). Die Parameter aus den Streukurven zeigen eine Zunahme der Partikelgröße im Lichtzustand. Dies entspricht den Erwartungen und ist auf die blaulicht-induzierte Entfaltung der A'- $\alpha$ -Helix und J $\alpha$ -Helix in der AuLOV-Domäne des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes zurückzuführen. Die Molekularmasse wurde nach *Rambo et al.*<sup>118</sup> berechnet und entspricht mit 51,0 kDa im Dunkelzustand der erwarteten Molekularmasse von 50,7 kDa für das mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstrukt

ohne His-tag (**Abbildung 24 A**). Die Masse des Lichtzustandes liegt mit 58,5 kDa etwas über der erwarteten Masse (**Abbildung 24 A**).



**Abbildung 24:** SAXS-basierte Charakterisierung des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes ohne His-tag. **A:** Gemittelte Streukurven des Licht- (455 nm,  $7,6 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) und Dunkelzustandes des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes ohne His-tag. Beide Kurven zeigen keine signifikanten Unterschiede auf. Basierend auf den Streukurven wurden die Parameter Dmax, Rg, I0 und die Molekularmasse (MM) ermittelt. **B:** Die *ab initio* Modelle des Licht- und Dunkelzustandes aus den gemittelten Streukurven. Die *ab initio* sind als Kugeln dargestellt, ein Homologiemodell des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes wurde zur Veranschaulichung in das Punktmodell gelegt. Die Domänenarchitektur des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 ist schematisch dargestellt.

Ein Grund dafür ist die Entfaltung der flankierenden Helices der AuLOV-Domäne und die damit verbundene Volumenzunahme unter Blaulicht. Interessanterweise zeigt der AuLOV-Wildtyp in diesem Konstrukt ein anderes Verhalten als es von der vorangegangenen Charakterisierung der einzelnen LOV-Domäne zu erwarten war. In dem Konstrukt zeigt der Wildtyp der die AuLOV-Domäne ein homogenes Verhalten unabhängig vom Belichtungszustand, wohingegen die einzelne Domäne ein heterogenes Verhalten zeigt. Ausgehend von Streukurven des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes wurde mit dem Programm ATSAS<sup>104</sup> ein *ab initio* Modell des Licht- und Dunkelzustandes erstellt (**Abbildung 24 B**). Bei der Erstellung eines *ab initio* Modells wird eine monodisperse Lösung und ein einheitlicher Kontrast angenommen.<sup>117</sup> Das Modell wird von einem Algorithmus auf mathematischen Grundlagen berechnet und als Kugelmodell ausgegeben.<sup>117</sup> Beide Modelle ähneln sich, jedoch zeigt der Lichtzustand ein größeres Volumen (**Abbildung 24 B**). Mit Chimera<sup>110</sup> wurde ein Homologiemodell des Licht- und Dunkelzustandes des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes ohne His-tag, basierend auf den AuLOV Kristallstrukturen (Lichtzustand = 5dkl<sup>48</sup> Dunkelzustand = 5a8b<sup>36</sup>) und der mCherry Kristallstruktur<sup>119</sup> erstellt. Das Homologiemodell wurde in das Kugelmodell gelegt. Beide Modelle kommen im monomeren Zustand gut übereinander zu liegen, die Domänenarchitektur ist schematisch dargestellt (**Abbildung 24 B**).

Basierend auf den SAXS Daten und den Daten der analytischen SEC-Chromatographie lässt sich annehmen, dass das mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstrukt im Licht- und Dunkelzustand in Lösung als Monomer vorliegt, obwohl die UV/VIS Spektren eine photoaktive AuLOV-Domäne zeigten und eine Dimerisierung erwartet wurde. Eine Blockierung der Dimerisierungsfläche durch das ungeordnet vorliegende C-terminale Degron wäre ein möglicher Grund. Finale Klarheit sollten Kristallisationsexperimente bringen. Nach zwei Wochen in Dunkelheit wurden Kristalle in rosettenartiger Form in den in Tabelle 25 gelisteten Bedingungen gefunden; jedoch lag die Auflösung bei etwa 7 Å und darüber. Der strukturelle Beweis für eine Domänenanordnung des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes konnte somit bisher nicht erbracht werden.

**Tabelle 25:** Bedingungen in den Kristallen des mCherry-3myc-AuLOV-cODC1 Konstruktes im Dunkelzustand gefunden wurden.

Bedingung	Zusammensetzung
PACT E2	0,2 M Natriumbromid, 20% (w/v) PEG 3350
Core I D5	0,2 M Lithiumchlorid und 20% (w/v) PEG 3350
Core I E12	0,1 M MES pH 5,0 und 20% (w/v) PEG 6000
Core IV E12	0,1 M HEPES pH 7,0 und 30% (w/v) PEG 6000

### 5.3 Entwicklung einer optogenetischen Anwendung basierend auf der AuLOV-Domäne in *S. cerevisiae*

Ziel dieses Teils ist es, eine optogenetische Anwendung aus der AuLOV-Domäne zu entwickeln und zur Anwendung in *S. cerevisiae* zu bringen. Die ersten Daten zu dem *in vivo* Verhalten der AuLOV-Domäne im photosensitiven Degronmodul aus der vorangegangenen Masterarbeit<sup>83</sup> und Vorarbeiten aus dem *Taxis* Labor, werden dabei berücksichtigt. In den Vorarbeiten zeigte sich, dass die AuLOV Domäne im Vergleich zur *AtLOV2* ein inverses Schaltverhalten zeigt und ein geringes Proteinlevel im photosensitiven Degronmodul mit aktivem Degron. Im ersten Teil des Kapitels soll dieses Verhalten überprüft werden und ein Grund für das niedrige Proteinlevel gefunden werden.

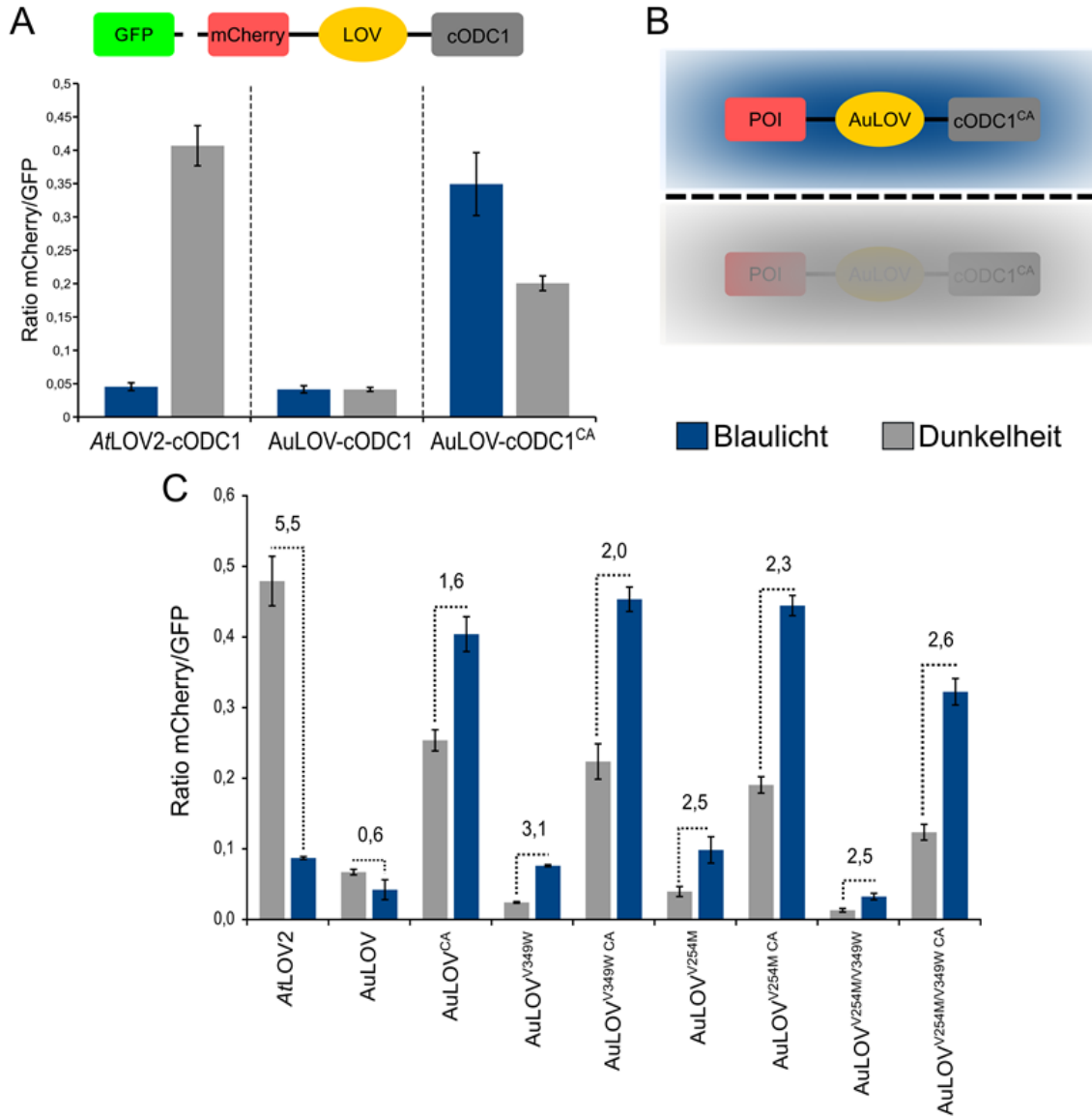
#### 5.3.1 Verbesserung des Schaltverhaltens der AuLOV-Domäne im *psd*-Modul

Die AuLOV-Domäne wurde in der vorangegangenen Masterarbeit und im *Taxis* Labor im photosensitiven Degronmodul getestet. Das Konstrukt besteht aus einem GFP-tag, welches als Reporter für das Proteinexpressionslevel dient. Dieses ist über einen P2A-Tag mit mCherry verbunden. Das P2A-Tag ist eine virale Sequenz mit einem NPGP-Motiv, welches zur Spaltung der Proteinsequenz durch „*ribosomal skipping*“ führt.<sup>29</sup> mCherry ist als Fluoreszenzreporter direkt mit der LOV-Domäne verbunden und gibt so Aufschluss über das Proteinlevel in der Zelle. Abschließend ist



## 5 Ergebnisse

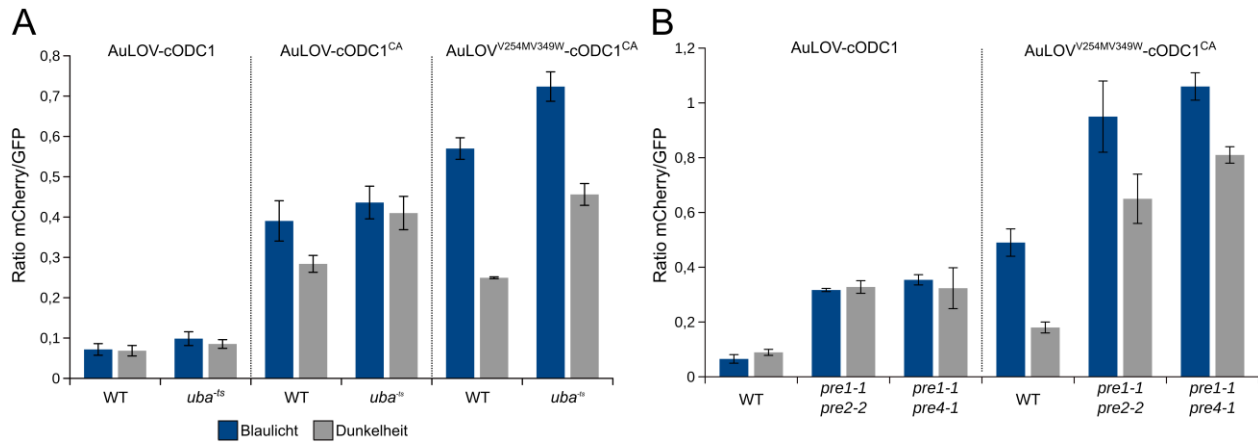
die LOV-Domäne C-terminal mit dem cODC1-Degron fusioniert (**Abbildung 25 A**). Im Vergleich zur *AtLOV2* zeigt die AuLOV-Domäne mit aktivem Degron ein geringeres Proteinlevel sowie kein Schaltverhalten. Durch Inaktivierung des Degrons (CA) zeigt die AuLOV-Domäne ein Schaltverhalten im psd-Modul, welches invers zu dem bekannten Verhalten ist (**Abbildung 25 B**).



**Abbildung 25:** Die AuLOV-Domäne im photosensitiven Degronmodul. **A:** Schematischer Aufbau der Konstrukte, GFP wird durch Hydrolyse nach der Translation abgespalten und dient als Kontrolle für die Proteinexpression. Die AuLOV-Domäne im psd-Modul zeigt mit inaktivem Degron (CA) eine Stabilisierung unter Blaulicht (465 nm, 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ), wohingegen das aktive Degron sowohl in Dunkelheit als auch unter Blaulicht nur geringes Proteinlevel zeigt. Die *AtLOV2* Domäne dient als Positivkontrolle. **B:** Die Funktionsweise der AuLOV-Domäne im psd-Modul ist schematisch dargestellt, welche eine Proteinstabilität unter Blaulicht zeigt und Proteindegradation in Dunkelheit. **C:** Ermittlung der Schaltraten der AuLOV-Mutanten im psd-Modul. Alle Mutanten zeigen mit aktivem Degron ein niedrigeres Proteinlevel als mit inaktivem Degron (CA). Die Schaltrate für die Doppelmutante AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> mit inaktivem Degron (CA) ist am größten bei einem hohen Proteinlevel.

Aus den Daten lässt sich schlussfolgern, dass die AuLOV-Domäne unter Blaulicht ein höheres Proteinlevel als in Dunkelheit zeigt. Dementsprechend findet eine Stabilisierung unter Blaulicht statt und eine Degradation in Dunkelheit (**Abbildung 25 B**). Aufgrund der Degradation mit inaktivem Degron ist anzunehmen, dass es sich um eine intrinsische Degradation AuLOV handelt und diese Ubiquitin-abhängig verläuft. Als Nächstes wurde versucht das Schaltverhalten durch gerichtete Mutagenese zu verbessern. Die beiden Dimerisierungsflächen-Mutanten (AuLOV<sup>V254M</sup> und AuLOV<sup>V349W</sup>) aus der vorangegangenen Masterarbeit wurden zu einer Doppelmutante AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> vereint und im Hefestamm EMS 356 auf ihr Schaltverhalten untersucht (**Abbildung 25 C**). Die Doppelmutante sowie die beiden Einzelmutanten zeigten mit aktivem Degron ein Schaltverhalten bei geringem Proteinlevel, wie es vom der AuLOV mit inaktivem Degron bekannt ist (**Abbildung 25 C**). Durch die Inaktivierung des Degrons (CA), konnte das Proteinlevel erhöht werden. Die Schaltrate ist für die Doppelmutante mit 2,6 höher als die der beiden Einzelmutanten und des Wildtyps (**Abbildung 25 C**). Alle Mutanten der AuLOV, wie auch diese selbst, zeigen eine intrinsische Degradation (**Abbildung 25 C**). Es ist anzunehmen, dass diese intrinsische Degradation der AuLOV-Domäne der Grund für die niedrigen Proteinlevel der Konstrukte mit aktivem Degron ist, da hier sowohl Ubiquitin-abhängige als auch Ubiquitin-unabhängige Degradationswege wirken. Durch die Inaktivierung des Degrons ist es möglich die Ubiquitin-unabhängige Degradation außen vorzulassen und so das Proteinlevel auf ein physiologisches Niveau anzuheben. Um zu überprüfen, ob es sich bei der intrinsischen Degradation um eine Ubiquitin-abhängige oder Ubiquitin-unabhängige Degradation handelt, wurden der AuLOV-Wildtyp und die Doppelmutante im psd-Modul in *S. cerevisiae* Stämmen darauf untersucht. Als Erstes wurde ein Stamm mit einem temperatursensitiven *UBA1* Allel verwendet, so dass die Aktivität des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 mittels Temperatur inhibiert werden kann (*uba<sup>-ts</sup>*). Die AuLOV-Domäne im psd-Modul mit aktivem Degron zeigt wie erwartet ein niedriges Proteinlevel im Wildtyp (JD47-13C) Stamm als auch im *uba<sup>-ts</sup>*-Stamm (JD77-1-1) (**Abbildung 26 A**). Die Inaktivierung des Degrons der AuLOV-Domäne im psd-Modul zeigt im *uba<sup>-ts</sup>*-Stamm in Dunkelheit und unter Blaulicht ein angeglichenes Proteinlevel, wohingegen die Kontrolle im Wildtypstamm (JD47-13C) ein Schaltverhalten zeigt (**Abbildung 26 A**). Die Doppelmutante mit inaktivem Degron im psd-Modul, zeigt im *uba<sup>-ts</sup>*-Stamm (JD77-1-1) eine Zunahme des Proteinlevels, sowie eine Annäherung der Proteinlevel in Dunkelheit und unter Blaulicht.

## 5 Ergebnisse



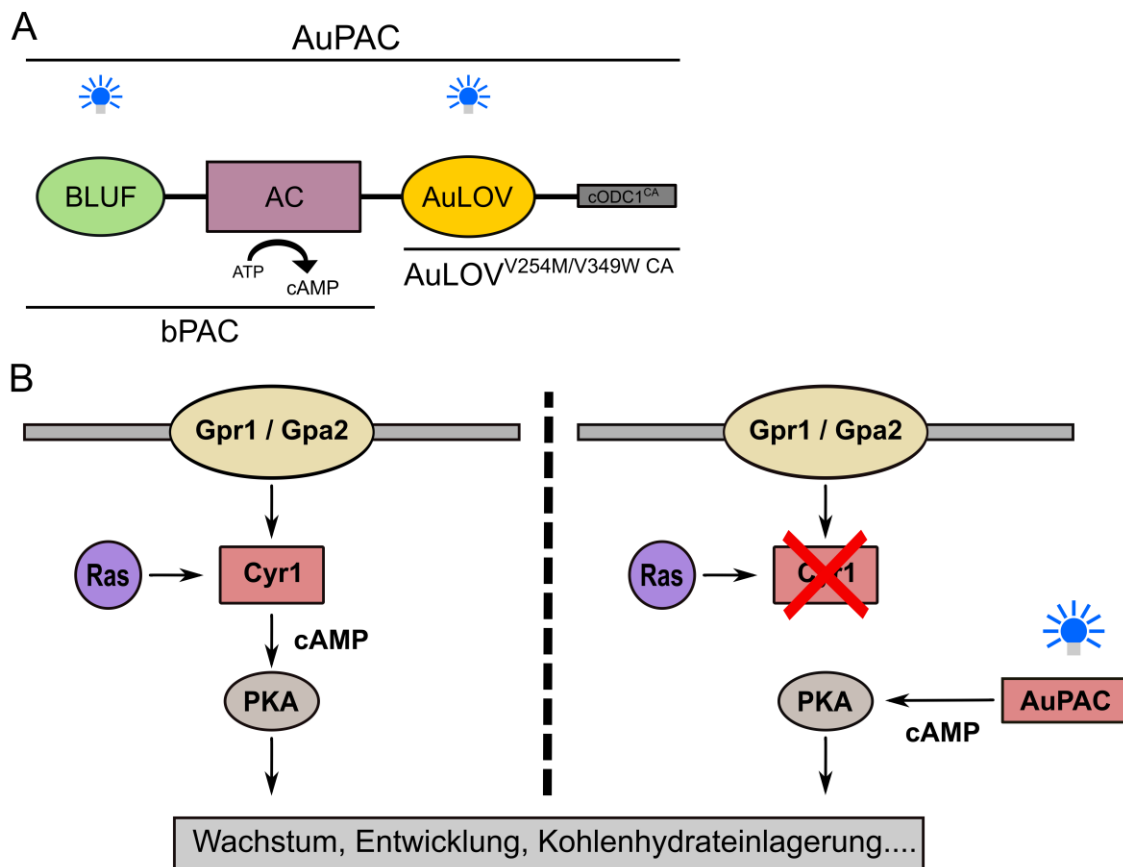
**Abbildung 26:** Untersuchungen zur intrinsischen Degradation der AuLOV-Domäne. **A:** Untersuchung der AuLOV-Domäne im psd-Modul mit aktivem und inaktivem (CA) Degron und der AuLOV-Doppelmutante mit inaktivem (CA) Degron im temperatursensitiven *uba<sup>ts</sup>*-Stamm (JD77-1-1), in diesem ist die Aktivität des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 mittels Temperatur inhibierbar. Sowohl AuLOV als auch die AuLOV-Doppelmutante zeigen eine Zunahme des Proteinlevels im *uba<sup>ts</sup>*-Stamm. Die Konstrukte mit inaktivem Degron (CA) zeigen im *uba<sup>ts</sup>*-Stamm eine Zunahme des Proteinlevels unter Blaulicht (465 nm, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) und in Dunkelheit im Vergleich zum Wildtypstamm. **B:** Sowohl die AuLOV mit aktiven Degron als auch die AuLOV Doppelmutante mit inaktivem Degron zeigen in den Proteasomen-geschädigten Stämmen (*pre1-1 pre2-2* (WCG11/12) und *pre1-1 pre4-1* (YHI29/14)) eine Zunahme des Proteinlevels im Vergleich zum Wildtypstamm (WCG4a), sowie ein angeglichenes Proteinlevel unter Blaulicht (465 nm, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) und in Dunkelheit.

Die Einzelmutanten der AuLOV wurden auch im *uba<sup>ts</sup>*-Stamm mit aktivem und inaktivem, photosensitivem Degron getestet; sie zeigen das oben beschriebene Verhalten der AuLOV-Domäne und der AuLOV-Doppelmutante (**Anhang Abbildung 45**). Die Verwendung zweier Proteasomen geschädigter Stämme (WCG11/12 und YHI29/14) mit der AuLOV-Domäne mit aktivem Degron und der Doppelmutante mit inaktivem Degron zeigt in beiden Fällen eine Zunahme des Proteinlevels im Vergleich zum Wildtypstamm (**Abbildung 26 B**). Die AuLOV im psd-Modul mit aktivem Degron zeigt in den Proteasomen geschädigten Stämmen ein angeglichenes Proteinlevel unter Blaulicht und in Dunkelheit (**Abbildung 26 B**). Die Doppelmutante mit psd-Modul mit inaktivem Degron zeigt eine Annäherung der Proteinlevel unter Blaulicht und in Dunkelheit (**Abbildung 26 B**). Im *uba<sup>ts</sup>*-Stamm (JD77-1-1) als auch in den Proteasomen geschädigten Stämmen (WCG11/12 und YHI29/14) zeigt die AuLOV-Domäne und ihre Doppelmutante ein ähnliches Verhalten. Damit konnte gezeigt werden, dass die AuLOV Konstrukte im psd-Modul einer intrinsischen Degradation unterliegen. Diese läuft in Dunkelheit stärker ab als unter Blaulicht, sodass es zu einem Schaltverhalten kommt. Dies liefert gleichzeitig die Erklärung, warum das Proteinlevel in den Konstrukten mit aktivem Degron sehr gering ist, da beide proteasomale Abbauwege das Proteinlevel verringern. Auf Grund der höchsten Schaltrate bei einem physiologisch relevanten Proteinlevel lässt sich AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> als Destabilisierungssequenz im Dunkeln verwenden. Diese Destabilisierungssequenz kann als

optogenetische Applikation mit anderen Proteinen fusioniert werden und bietet das Potential zur Steuerung des Proteinlevels von Zielproteinen.

### 5.3.2 Entwicklung einer AuLOV basierten Anwendung in *S. cerevisiae*.

Die Tests der AuLOV-Mutanten mit photosensitiven Degron zeigten, dass das AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> Konstrukt als Destabilisierungssequenz im Dunkeln verwendet werden kann. Ziel ist es mit ihr eine weitere optogenetische Anwendung in *S. cerevisiae* zu entwickeln. Die Idee ist, diese Destabilisierungssequenz mit bPAC, der photosensitiven Adenylatcyclase aus der Gattung *Beggiatoa*, zu fusionieren. bPAC besteht aus einer Adenylatcyclase (AC) und einer BLUF-Domäne; bei der BLUF-Domäne handelt es sich auch um einen Blaulichtphotorezeptor (**Abbildung 27 A**).<sup>54</sup> Die AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> Domäne wurde C-terminal an die Adenylatcyclase fusioniert (**Abbildung 27 A**).



**Abbildung 27:** Schematische Darstellung der AuPAC und ihre Applikation in *S. cerevisiae*. **A:** Schematische Darstellung des Fusionskonstrukts der AuLOV-Doppelmutante mit inaktiven Degron und der bPAC. Die AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup>-Domäne wurde C-terminal an bPAC fusioniert, um die Adenylatcyclase (AC) über Blaulicht mit zwei Photorezeptoren (N-terminal, sowie C-terminal) zu regulieren. Dieses Konstrukt wird als AuPAC bezeichnet. **B:** Ziel ist es, die AuPAC in einen *S. cerevisiae* Stamm einzubringen, dessen natürliche Adenylatcyclase (Cyr1) deletiert wurde und somit über AuPAC die Zellfunktionen zu steuern.

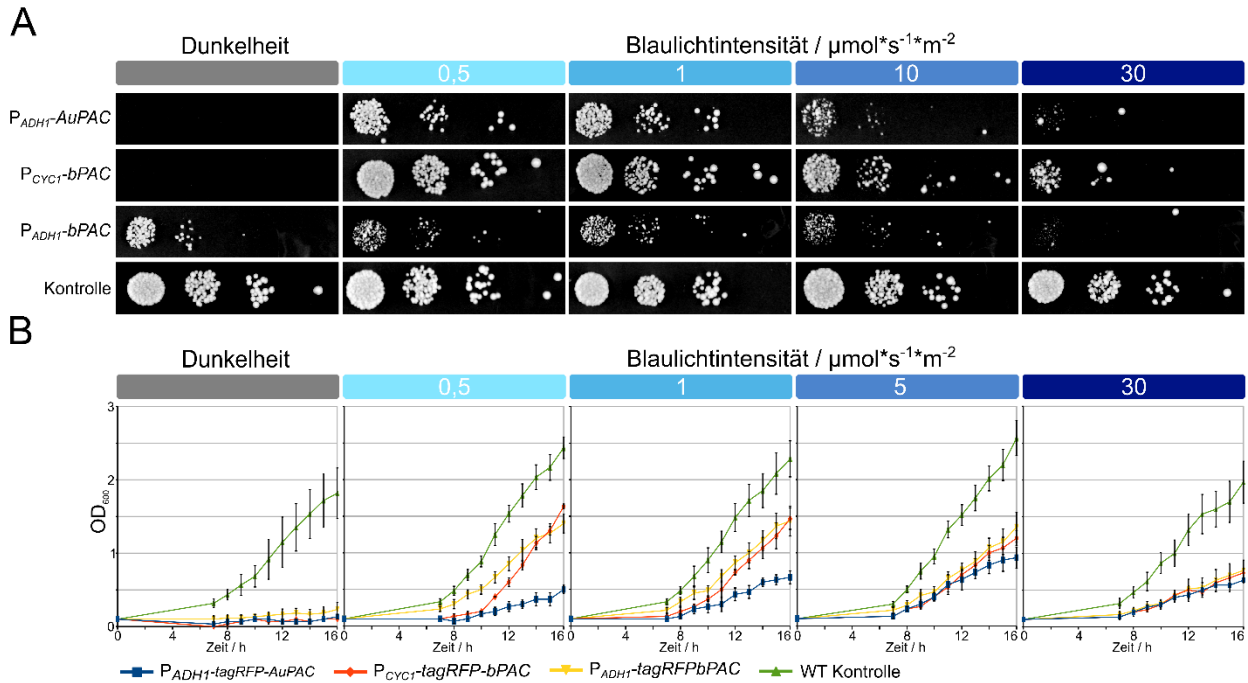
Die so entstandene AuPAC ist damit eine synthetische Adenylatcyclase, die sowohl N- auch C-terminal von einem Blaulichtphotorezeptor kontrolliert wird (**Abbildung 27 A**). Zusätzlich steht die AuPAC auch unter der Kontrolle der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> Domäne, sodass AuPAC im Dunkeln destabilisiert wird, was zu einem geringeren Proteinlevel in Dunkelheit führt. Ziel der AuPAC ist die Steuerung des cAMP-Levels mit Blaulicht um das Wachstum und die Entwicklung der *S. cerevisiae* Stämme zu beeinflussen; gleichzeitig wird das Proteinlevel von AuPAC durch die Destabilisierungssequenz kontrolliert. Dafür wurde in einen *S. cerevisiae* Stamm, dem die natürliche Adenylatcyclase (Cyr1) fehlt, die AuPAC als photosensitive Adenylatcyclase eingebracht (**Abbildung 27 B**). Über den PKA-Signalweg kann so in Abhängigkeit von Blaulicht Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und auf weitere über den PKA-Signalweg gesteuerte Funktionen Einfluss genommen werden (**Abbildung 27 B**).

### 5.3.3 AuPAC als blaulichtabhängige Adenylatcyclase in *S. cerevisiae*

Mit Hilfe von Wachstumstests soll überprüft werden, ob es möglich ist mit Hilfe der AuPAC über den PKA-Signalweg das Wachstumsverhalten von *S. cerevisiae* zu kontrollieren. Dazu wurde die natürliche Adenylatcyclase Cyr1 durch AuPAC ersetzt. Wachstumstests auf Agarplatten haben gezeigt, dass die Stämme mit AuPAC (YSeb5/6), unter Kontrolle des *ADHI*-Promotors, in Dunkelheit kein Wachstum und bei hohen Blaulichtintensitäten ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  und  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) ein gehindertes Wachstum zeigen (**Abbildung 28 A**). Der Stamm mit bPAC, unter Kontrolle des schwachen *CYCI*-Promotors (YSeb38), zeigt ein ähnliches Verhalten mit stärkerem Wachstum unter hoher Blaulichtintensität ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  und  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) (**Abbildung 28 A**). Ist bPAC unter Kontrolle des starken *ADHI*-Promotors (YJT14), zeigen die Zellen unter allen Lichtbedingung ein schwaches Wachstum (**Abbildung 28 A**). Die Wachstumstests auf Agarplatten zeigen, dass mit AuPAC (YSeb5/6) die Kontrolle des Wachstums in Abhängigkeit von Blaulicht über den PKA-Signalweg möglich ist. In flüssigem Medium hingegen ist nach 16 Stunden in Dunkelheit für keinen der Stämme mit lichtabhängiger Adenylatcyclase ein messbares Wachstum zu verzeichnen (**Abbildung 28 B**). Beide bPAC Stämme zeigen bei niedrigen Blaulichtintensitäten ( $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) ein schnelleres Wachstum als der AuPAC Stamm (**Abbildung 28 B**). Bei mittleren Blaulichtintensitäten zeigen alle Stämme ein Wachstumsverhalten in vergleichbarer Geschwindigkeit (**Abbildung 28 B**). Der AuPAC Stamm zeigt bei einer Blaulichtintensität von  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  sein bestes Wachstumsverhalten (**Abbildung 28 B**). Bei sehr hoher Blaulichtintensität ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ )

## 5 Ergebnisse

zeigt der AuPAC Stamm ein ähnliches Wachstumsverhalten im Vergleich zu den beiden bPAC Stämmen (**Abbildung 28 B**).



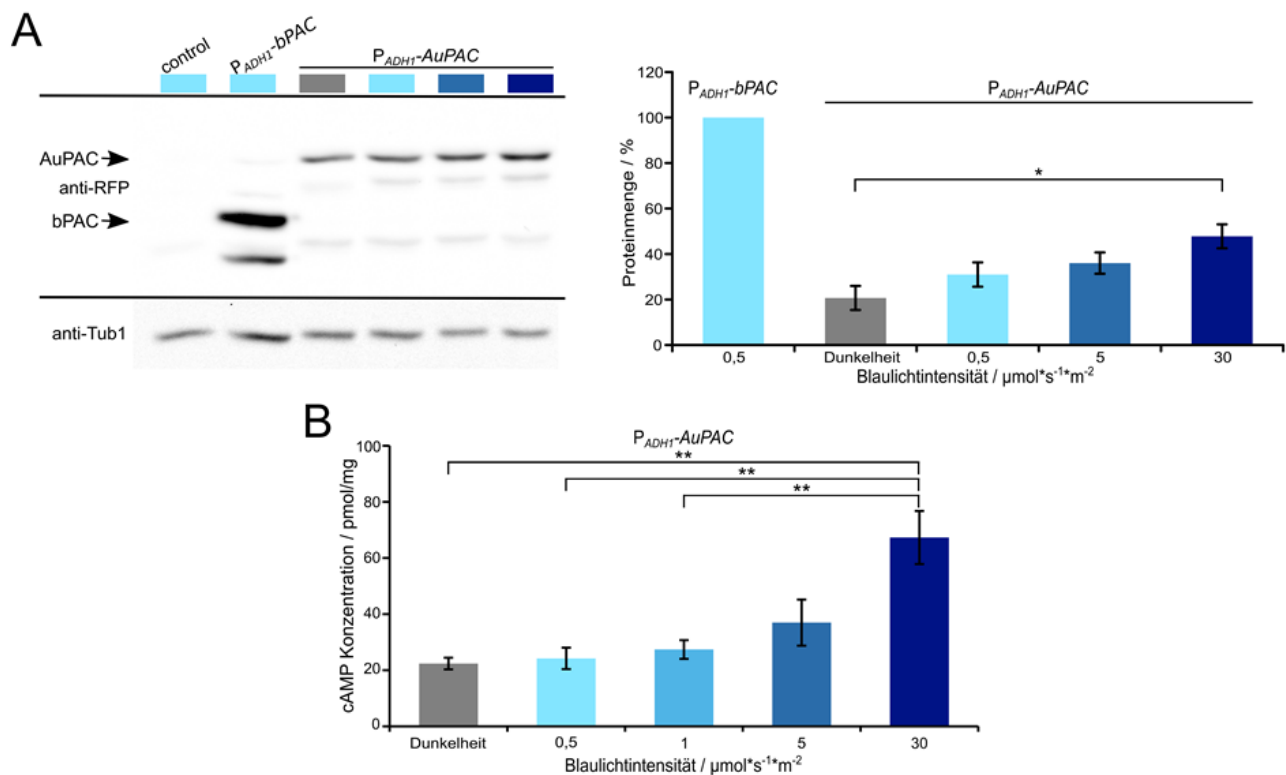
**Abbildung 28:** Wachstumstests der Stämme in denen die natürliche Adenylatcyclase durch die blaublichtsensitiven Adenylatcyclasen AuPAC (YSeb5/6) oder bPAC unter der Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren (schwacher Promoter= CYC1 (YSeb38) und starker Promoter= ADH1 (YJT14)) ersetzt wurde. **A:** Die Wachstumstests wurden auf SC-Agar Platten durchgeführt. Die Wachstumstests auf Agarplatten zeigen, dass die Stämme  $P_{ADH1}\text{-AuPAC}$  und  $P_{CYC1}\text{-bPAC}$  in Dunkelheit kein Wachstum aufweisen. Bei höheren Blaublichtintensitäten (465 nm) zeigt der AuPAC Stamm ein schwächeres Wachstumsverhalten als der  $P_{CYC1}\text{-bPAC}$  Stamm. Der  $P_{ADH1}\text{-bPAC}$  Stamm hingegen wächst unter allen Beleuchtungsbedingungen schwach. **B:** In flüssigem Medium zeigen alle Stämme in Dunkelheit so gut wie kein Wachstum. Mit zunehmender Lichtintensität (465 nm) nimmt das Wachstum in den lichtabhängigen Stämmen zu. Der  $P_{ADH1}\text{-AuPAC}$  Stamm zeigt sein bestes Wachstumsverhalten unter  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  Blaublicht (465 nm).

Interessanterweise weist auch die Kontrolle, der Wildtyp-Stamm mit der natürlichen Adenylatcyclase (Cyr1), eine Wachstumsabhängigkeit von den Blaublichtintensitäten auf. In Dunkelheit und bei sehr hoher Blaublichtintensität ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) weist die Kontrolle ein leicht vermindertes Wachstum auf (**Abbildung 28 B**). Dieser Effekt konnte nicht bei dem Wachstumstest auf den Agarplatten beobachtet werden. Auch die Wachstumstests in Flüssigmedium zeigen, dass AuPAC in Blaublichtabhängigkeit wächst, jedoch ist das Wachstumsverhalten auf Platten und in flüssiger Kultur sehr unterschiedlich. Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten auf Platten und in Flüssigmedium zeigt sich auch bei den bPAC Stämmen. Schlussendlich war es mit dem Wachstumstest möglich aufzuzeigen, dass mit Blaublicht über die AuPAC Einfluss auf das Wachstumsverhalten über den PKA-Signalweg genommen werden kann. Interessanterweise wurde unter vollständigem Lichtausschluss kein Wachstum beobachtet. Eine Erklärung dafür ist der Übergang von der Proteinkinase A in die Ruhephase wie von *de Virgilio* beschrieben.<sup>120</sup> Wie erwartet wurde unter moderaten

## 5 Ergebnisse

Blaulichintensitäten ein gesteigertes Wachstum beobachtet. Höhere Blaulichtintensität führte zu einem verminderten Wachstum, sodass das Wachstum nicht mit dem AuPAC Proteinlevel korreliert. Dieses verminderte Wachstum kann auf die von *Bolte et al.* beschriebene PKA-abhängige Hemmung des *anaphase-promoting* Komplexes zurückgeführt werden.<sup>120,121</sup>

Im nächsten Schritt wurde das Proteinlevel der AuPAC unter verschiedenen Blaulichtbedingungen bestimmt. Mit zunehmender Blaulichtintensität nimmt das Proteinlevel zu (**Abbildung 29 A**). Dies geht mit den vorherigen Untersuchungen der AuLOV-Domäne einher, da eine Stabilisierung unter Blaulicht bzw. Destabilisierung in Dunkelheit erwartet wird (siehe 5.3.1). So ist zu erwarten, dass über das Proteinlevel auch das cAMP-Level eingestellt werden kann. Über MS-HPLC wurde das cAMP-Level der drei lichtabhängigen Stämme bestimmt. Die MS-HPLC Analyse wurde von der *Metabolomics Core Unit* der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.



**Abbildung 29:** Analyse der Proteinmenge und der cAMP Mengen in dem AuPAC Stamm (YSeb5/6 und YSeb12). **A:** Analyse der Proteinmenge des AuPAC Konstruktes in *S. cerevisiae* (YSeb5/6) mittels Immunodetektion, in Abhängigkeit von Blaulicht. Mit zunehmender Blaulichtintensität (465 nm) nimmt auch die Menge an AuPAC in der Zelle zu. Die Menge in Dunkelheit ist signifikant niedriger als die unter  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  Blaulicht mit  $p \leq 0,05$ . **B:** Die cAMP Konzentration im AuPAC Stamm (YSeb12) wurde mittels HPLC-MS bestimmt. Auch hier zeigt sich eine Zunahme des Levels mit steigender Blaulichtintensität (465 nm). Signifikant unterschiedlich sind die mit \*\* markierten Paare mit  $p \leq 0,01$ .

Das cAMP-Level des AuPAC Stamms zeigt wie erwartet eine Zunahme der cAMP-Konzentration mit zunehmender Intensität des Blaulichtes (**Abbildung 29 A**) und eine eindeutige Korrelation mit der

Proteinmenge (**Abbildung 29 A, B**). Die Proteinmenge nimmt etwa um den Faktor 2,5 (Dunkelheit zu  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  Blaulicht) zu und das cAMP-Level um etwa den Faktor 3. In dem Stamm (YJT14) mit bPAC unter Kontrolle des starken *ADHI*-Promotors wurde auch eine kontinuierliche Zunahme des cAMP-Levels mit zunehmender Blaulichtintensität beobachtet (**Abbildung 46 A**). Der Stamm mit bPAC unter Kontrolle des schwachen *CYCI*-Promotors (YSeb38) hingegen weist eine geringe Zunahme bei  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  Blaulicht auf und zusätzlich wurde eine sprunghafte Zunahme bei  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  Blaulicht beobachtet (**Abbildung 46 B**). Interessanterweise, ist das cAMP-Levels der bPAC Stämme (YSeb38 und YJT14) in Dunkelheit (**Anhang Abbildung 46**) im Vergleich zum AuPAC Stamm (YSeb12) bei  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  eindeutig höher. Die Bestimmung des cAMP-Levels zeigt im AuPAC-Stamm (YSeb12) eine Korrelation zum Proteinlevel (YSeb5/6). Im Gegensatz dazu zeigen die bPAC-Stämme (YSeb38 und YJT14) und der AuPAC-Stamm (YSeb12) stark unterschiedliche cAMP-Konzentrationen, sodass ein allgemeiner Rückschluss zwischen Wachstumsverhalten und cAMP-Level nicht möglich ist. Eine eindeutige Erklärung hierfür ist bisher nicht möglich. Eine Möglichkeit können intrazelluläre Prozesse sein, die das cAMP unterschiedlich stark in den Zellen abbauen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mit der Kombination der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> Domäne und bPAC zu AuPAC eine optogenetische Applikation geschaffen wurde. So nimmt AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> Einfluss auf das Proteinlevel von AuPAC, so dass eine Steuerung des cAMP-Levels möglich ist.

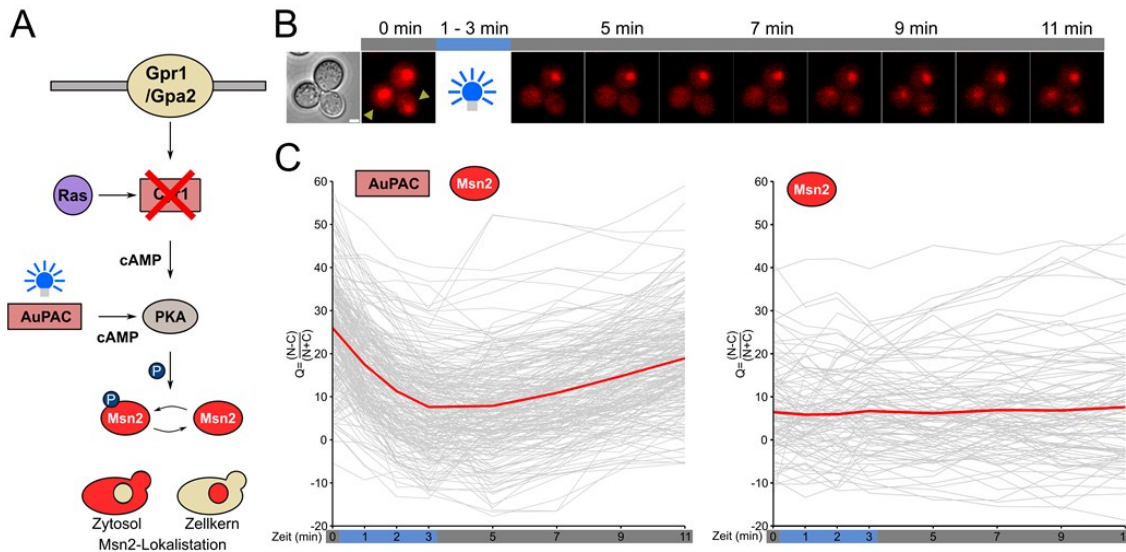
### 5.3.4 Kontrolle der Msn2-Lokalisation durch AuPAC in *S. cerevisiae*

Es hat sich gezeigt, dass sich mit AuPAC erfolgreich das cAMP-Level in *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von Blaulicht verändern lässt. Ziel einer optogenetischen Applikation ist es zelluläre Prozesse zusteuern. Beabsichtigt ist die Lokalisation des Transkriptionsfaktor Msn2 zusteuern, da diese abhängig von der cAMP-Konzentration ist und Msn2 direkt über den PKA-Signalweg phosphoryliert wird (**Abbildung 30 A**).<sup>122,123</sup> Mit Hilfe der cAMP-abhängigen Lokalisation von Msn2 soll gezeigt werden, dass AuPAC auf einem physiologisch-relevanten Level arbeitet und so *in vivo* die Steuerung von Msn2 übernehmen kann. Msn2 wird an dem RRxS-Motiv phosphoryliert, welches mit einer Export- und Importsequenz für den Nukleus versehen ist.<sup>122</sup> Ist Msn2 phosphoryliert, so lokalisiert es im Zytosol. Ist es nicht phosphoryliert, so liegt es im Nukleus vor (**Abbildung 30 A**).<sup>124</sup> Unter Verwendung einer Msn2-mCherry Fusion wurde die Lokalisation *in vivo* in *S. cerevisiae* mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt (YSeb18). In der Dunkelheit zeigt sich eine Lokalisierung im



## 5 Ergebnisse

Nukleus. Nach 3 min Blaulichtbeleuchtung ist das Signal aus dem Nukleus verschwunden und über das Zytosol verteilt (**Abbildung 30 B**).



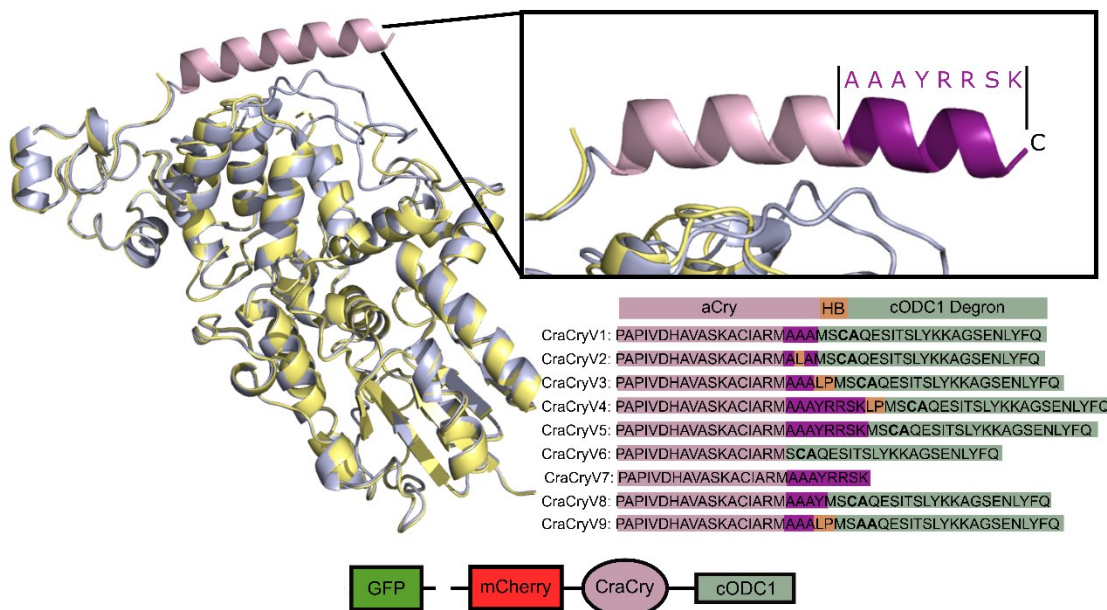
**Abbildung 30:** Kontrolle der Lokalisation des Transkriptionsfaktors Msn2 mit mCherry-Tag durch AuPAC in *S. cerevisiae* (YSeb18). **A:** Schematische Darstellung der Einflussnahme von AuPAC auf die Msn2-Lokalisierung. Das cAMP-Level wird über PKA kontrolliert, welche für die Phosphorylierung von Msn2 zuständig ist. Msn2 liegt phosphoryliert im Zytosol vor. Sobald die PKA nicht aktiv ist und Msn2 nicht phosphoryliert ist, lokalisiert sich Msn2 im Nukleus. **B:** In Dunkelheit ist Msn2 im Nukleus lokalisiert und nach 3 min Blaulichtbeleuchtung (450 nm) ist Msn2 über das Zytosol verteilt. Mit zunehmender Dunkeladaptierung lokalisiert sich Msn2 wieder im Zellkern. **C:** Quantifizierung der Fluoreszenzbilder für den AuPAC Stamm und der Kontrolle mit der natürlichen Adenylatcyclase zur Msn2-Lokalisation. Der Stamm (YSeb18) mit AuPAC als Adenylatcyclase zeigt nach 3 min Blaulicht (450 nm), dass das Nukleus/Zytosol-Verhältnis von etwa 25 auf unter 10 abgefallen ist. Das Nukleus/Zytosol-Verhältnis bleibt ca. 2 min lang in Dunkelheit konstant, nach 8 min Inkubation in Dunkelheit steigt es wieder auf 20 an. Die Kontrolle mit nur Msn2 zeigt keine Veränderung des Nukleus/Zytosol-Verhältnisses.

Anschließend Inkubation in Dunkelheit führt nach 8 min zur Relokalisation von Msn2 im Nukleus (**Abbildung 30 B**). Die Quantifizierung der Fluoreszenzbilder des AuPAC Stammes zeigt eine Abnahme des Nukleus/Zytosol-Verhältnisses von etwa 25 auf 10 (**Abbildung 30 C**). Dieses niedrige Level wurde anschließend für etwa 2 min gehalten (**Abbildung 30 C**). Nach 2 min in Dunkelheit lokalisiert Msn2 wieder im Nukleus, was mit einem Anstieg des Nukleus/Zytosol-Verhältnisses einhergeht. Nach 8 min in Dunkelheit ist das Nukleus/Zytosol-Verhältnis wieder fast auf den Ausgangswert angestiegen (**Abbildung 30 C**). Die Kontrolle mit der natürlichen Adenylatcyclase zeigt keine Veränderung des Nukleus/Zytosol-Verhältnisses über die Zeit, was für ein konstantes cAMP-Level spricht. Mit der Msn2-Lokalisation konnte gezeigt werden, dass AuPAC in der Lage ist, auf zellulärer Ebene Prozesse in *S. cerevisiae* über die Veränderung der cAMP-Konzentration zu steuern. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich sagen, dass es sich bei der AuPAC um eine synthetische, lichtabhängige Adenylatcyclase zur Steuerung von cAMP-abhängigen Prozessen in Abhängigkeit von Blaulicht handelt. Mit der Fusion von AuLOV<sup>V254M</sup>/V349W-cODC1<sup>CA</sup> und bPAC

konnte gezeigt werden, dass mit der Destabilisierungs-Domäne AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> das Proteinlevel in AuPAC gezielt gesteuert werden kann, um Einfluss auf physiologisch relevante Prozesse zunehmen.

#### 5.4 Das *animal-like* Cryptochroms (CraCry) aus *C. reinhardtii* im photosensitiven Degronmodul

Strukturelle, zeitaufgelöste Untersuchungen des *animal-like* Cryptochroms (CraCry) aus *C. reinhardtii* wurden am SACLA X-FEL (Spring8) des RIKEN Institutes in Japan von Mitarbeitern der AG Essen und einem internationalen Team durchgeführt. Es war möglich, mit Hilfe der zeitaufgelösten Kristallografie in CraCry die strukturellen Änderungen von dem oxidierten in den semireduzierten Zustand zu verfolgen. Während der Änderung des Redoxzustandes kommt es zur Entfaltung der C-terminalen Helix (Abbildung 31). Basierend auf diesen Daten entwickelte sich die Idee, dass CraCry als eine Art „Super LOV-Domäne“ fungieren könnte, in der die Redoxzustände mit verschiedenen Wellenlängen (Abbildung 10) angeregt werden, sodass CraCry in einer optogenetischen Anwendung fungieren könnte. Eine Erste Überprüfung dieser Hypothese soll mit CraCry im Kontext des psd-Moduls erfolgen.



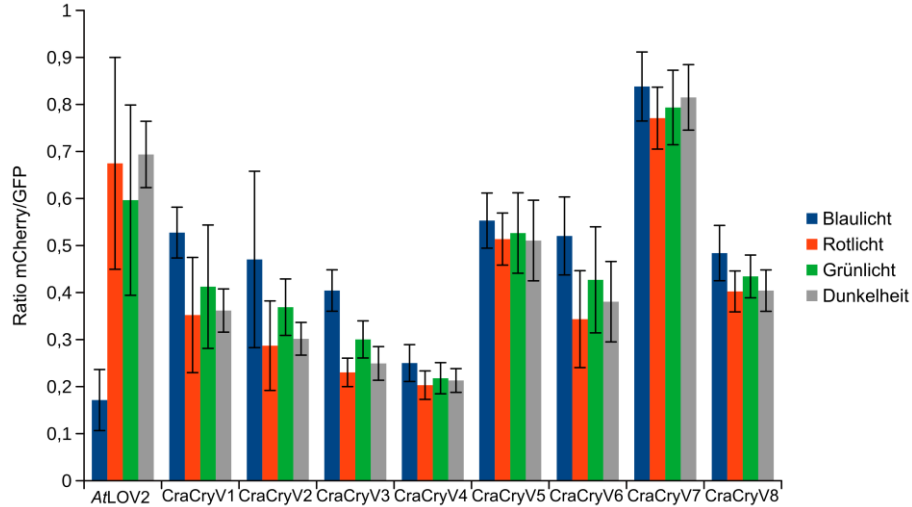
**Abbildung 31:** Kristallstruktur von CraCryΔ496 im semireduzierten Zustand (gelb) und im oxidierten Zustand (blau). Die C-terminale Helix (pink) liegt im oxidierten Zustand gefaltet vor, im semireduzierten Zustand ist diese entfaltet und in der Kristallstruktur nicht zu erkennen. CraCry wird im psd-Modul mit mCherry als Fluoreszenzreporter und GFP als Kontrolle für das Expressionslevel genutzt, für die verschiedenen Varianten ist der Übergang von CraCry zum cODC1 Degron dargestellt. Das Cystein-Alanin Motiv (CA) für das aktive psd-Modul und das Alanin-Alanin Motiv (AA; inaktives Degron) ist in der Degronsequenz in fetten Buchstaben geschrieben, in orange ist das Helix-brechende Motiv, in grün das cODC1 Degron und in pink die C-terminale Helix von CraCry dargestellt. In violett sind die Aminosäuren dargestellt, die am Übergang C-terminale Helix cODC1-Degron variiert wurden.

Dazu wurden basierend auf der Kristallstruktur im ersten Schritt acht verschiedene Konstrukte entworfen (**Abbildung 31**), in denen mCherry als Fluoreszenzreporter und GFP zur Expressionskontrolle dient. GFP ist über eine P2A-Sequenz mit mCherry verbunden und spaltet die Proteinsequenz durch *ribosomal skipping*.<sup>29</sup> Das Konstrukt CraCryV7 ohne Degronsequenz dient als Negativkontrolle, um eine intrinsische Degradation, wie sie bei der AuLOV beobachtet wurde, zu erkennen. Später wurde anhand der ersten Messungen ein weiteres Konstrukt mit inaktivem Degron (CraCryV9) entworfen. Die entworfenen Konstrukte besitzen zum Teil ein Helix-aufbrechendes Motiv, um eine vollständige Entfaltung der Degronsequenz zu gewährleisten. Für erste Experimente mit den Konstrukten soll die Anregung des FADs von CraCry im oxidierten/semichinoiden und im semireduzierten Zustand erfolgen. Dazu wurde Blaulicht (465 nm) für den oxidierten Zustand und Rotlicht (630 nm) spezifisch für den semireduzierten Zustand verwendet. Die Bestrahlung mit Grünlicht (530 nm) und die Inkubation im Dunkeln wurde zusätzlich überprüft sowie eine Kombination aus blauem und rotem Licht.

### 5.4.1 Erste Messungen des animal-like Cryptochroms im photosensitiven Degronmodul

Für die ersten Messungen wurden die in **Abbildung 32** gelisteten Konstrukte CraCryV1 bis CraCryV8 überprüft. Dazu wurden die *S. cerevisiae* Stämme unter verschiedenen Lichtbedingungen im *steady-state* Zustand vermessen. Das psd-Modul der ersten Generation (*AtLOV2*) wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Positivkontrolle zeigt das bekannte Schaltverhalten von Dunkelheit zu Blaulicht, aber wie erwartet keine Änderung unter den anderen Lichtbedingungen (**Abbildung 32**). Die degron-freie Variante 7 verhielt sich wie postuliert. Da keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Lichtbedingungen feststellbar waren (**Abbildung 32**) und der Schalfaktor eins beträgt (**Tabelle 26**), kann eine intrinsische Degradation der CraCry-Konstrukte ausgeschlossen werden. Die CraCry-Varianten vier, fünf und acht zeigen kein eindeutiges Schaltverhalten, sondern nur ein verringertes Proteinlevel (**Abbildung 32**). Dies spricht für eine dauerhafte Zugänglichkeit des Degrons für das Proteasom unter allen Lichtbedingungen. Variante eins bis drei und Variante sechs zeigen erkennbares Schaltverhalten zwischen Blaulicht und Rotlicht (**Abbildung 32, Tabelle 26**). Auch unter Grünlicht und in Dunkelheit ist eine Verringerung des Proteinlevels und ein niedrigerer Schalfaktor im Vergleich zum Proteinlevel unter Blaulicht zu erkennen (**Abbildung 32, Tabelle 26**). Aufgrund der Schwankungsbreite und des besten Schalfaktors in der Messung wurde die CraCry-Variante drei für weitere Experimente verwendet. Als Nächstes wurde basierend auf Variante drei (CraCryV3) ein Konstrukt mit inaktivem Degron erzeugt (CraCryV9).

## 5 Ergebnisse



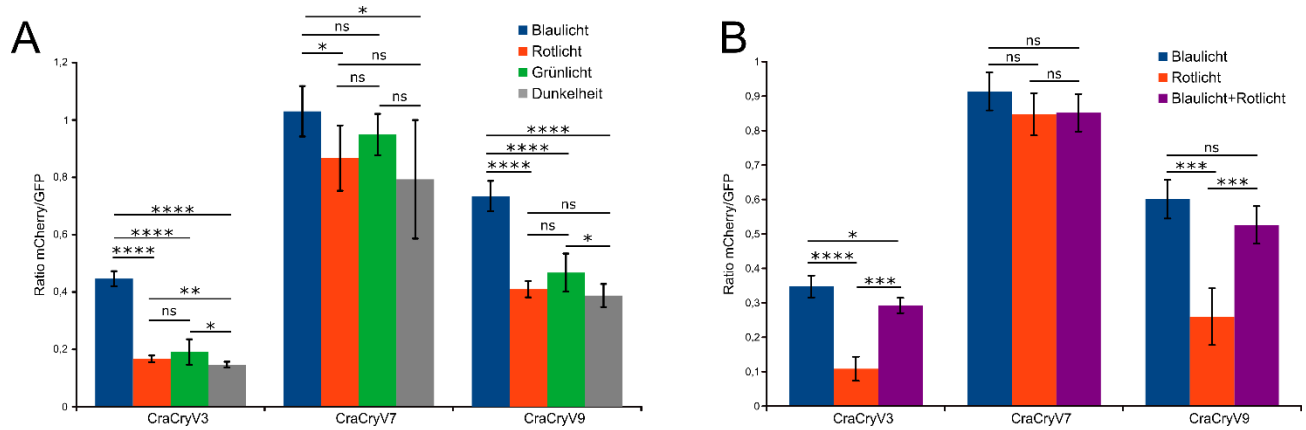
**Abbildung 32:** Erste Messungen der CraCry-Varianten im psd-Modul-Kontext mit aktivem Degron unter verschiedenen Lichtbedingungen (blau= 465 nm, grün = 530 nm, rot = 630 nm, jeweils  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) und in Dunkelheit. Das LOV-basierte psd-Modul der ersten Generation (*AtLOV2*) dient als Positivkontrolle. Variante 7 zeigt, wie erwartet keinen Unterschied zwischen den einzelnen Lichtbedingungen bei einem hohen Proteinlevel. Die Varianten vier, fünf und acht zeigen auch keinen Unterschied zwischen den einzelnen Lichtbedingungen, jedoch ein wesentlich niedrigeres Proteinlevel. Nur die Varianten ein bis drei und sechs zeigen ein mögliches Schaltverhalten.

**Tabelle 26:** Schaltfaktoren der CraCry-Varianten aus der initialen Messung.

Variante	Schaltfaktor		
	Blaulicht/Rotlicht	Blaulicht/Grünlicht	Blaulicht/Dunkelheit
CraCryV1	1,5 +/- 0,1	1,3 +/- 0,1	1,4 +/- 0,2
CraCryV2	1,6 +/- 0,2	1,2 +/- 0,1	1,5 +/- 0,1
CraCryV3	1,8 +/- 0,2	1,3 +/- 0,1	1,6 +/- 0,2
CraCryV4	1,2 +/- 0,2	1,1 +/- 0,1	1,2 +/- 0,2
CraCryV5	1,1 +/- 0,0	1,0 +/- 0,0	1,1 +/- 0,1
CraCryV6	1,5 +/- 0,1	1,2 +/- 0,2	1,4 +/- 0,2
CraCryV7	1,1 +/- 0,0	1,0 +/- 0,0	1,0 +/- 0,0
CraCryV8	1,2 +/- 0,1	1,1 +/- 0,0	1,2 +/- 0,1

Die Variante neun (CraCryV9) mit inaktivem Degron wurde auf ihr Verhalten unter Blaulicht, Grünlicht, Rotlicht und in Dunkelheit überprüft. Die Variante CraCryV9 zeigt interessanterweise ein ähnliches Verhalten wie die Variante CraCryV3 mit einem höheren Proteinlevel (**Abbildung 33 A**). Ein Schaltverhalten zwischen Blaulicht und den anderen Lichtbedingung ist weiterhin zu erkennen (**Abbildung 33 A**), was auf einen Abbau auch mit inaktivem Degron schließen lässt. Da Variante sieben ohne Degron keinen Abbau zeigt, aber auf CraCry $\Delta$ 496 beruht und somit keine C-terminale Verlängerung besitzt, kann es sein, dass das inaktive Degron eine ähnliche Funktion wie die C-terminale Verlängerung übernimmt.

## 5 Ergebnisse



**Abbildung 33:** Überprüfung der CraCry-Variante neun (CraCryV9), mit den Varianten drei und sieben als Kontrolle unter verschiedenen Lichtbedingungen (blau= 465 nm, grün = 530 nm, rot = 630 nm, jeweils  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) und in Dunkelheit. **A:** CraCryV9 zeigt ein ähnliches Verhalten wie CraCryV3 nur mit angehobenem Proteinlevel. Die Variante CraCryV9 zeigt ein Schaltverhalten von Blaulicht zu allen anderen Lichtbedingungen. **B:** Test des Einflusses durch gleichzeitige Bestrahlung mit Blaulicht und Rotlicht (blau= 465 nm und rot = 630 nm, jeweils  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) auf die Varianten drei, sieben und neun. Die gleichzeitige Bestrahlung mit Blaulicht und Rotlicht führt zu einer Verringerung des Proteinlevels im Vergleich zu dem bei der Bestrahlung mit Blaulicht. Signifikant nicht unterschiedlich sind die Paare mit ns =  $p > 0,05$  und Signifikant unterschiedlich sind die Paare mit \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ .

Die resultierenden Schaltfaktoren liegen für die Variante drei (CraCryV3) höher als in der initialen Messung (**Tabelle 27**). Im direkten Vergleich ist das Schaltverhalten von CraCryV3 mit einem Schaltfaktor von 2,7 besser als von CraCryV9, dessen Schaltfaktor nur 1,6 beträgt (**Tabelle 27**). Des Weiteren wurde das Verhalten der Varianten drei, sieben und neun unter der gleichzeitigen Bestrahlung mit Blau- und Rotlicht untersucht (**Abbildung 33 B**). Die gleichzeitige Bestrahlung mit blauem und rotem Licht führt zu einer schwächeren Verringerung des Proteinlevels im Vergleich zu der Bestrahlung mit blauem Licht (**Abbildung 33 B**).

**Tabelle 27:** Schaltfaktoren der CraCry-Varianten aus Abbildung 33 A.

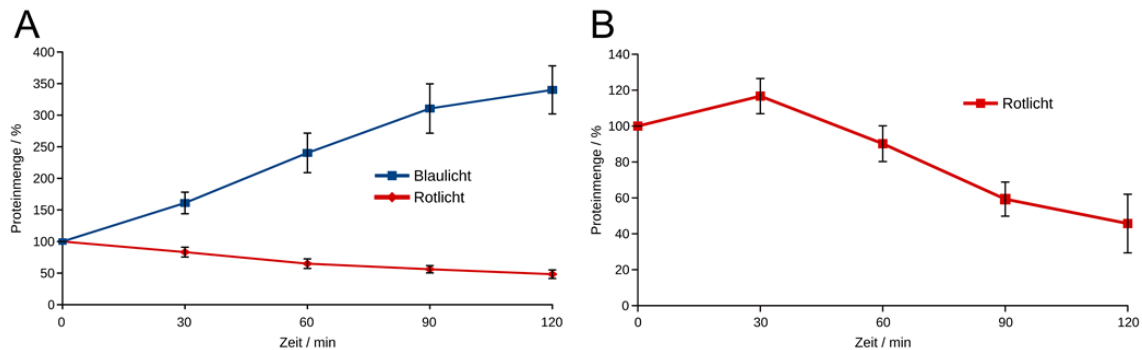
Variante	Schaltfaktor		
	Blaulicht/Rotlicht	Blaulicht/Grünlicht	Blaulicht/Dunkelheit
CraCryV3	2,7 +/- 0,0	2,5 +/- 0,1	3,0 +/- 0,2
CraCryV7	1,2 +/- 0,2	1,1 +/- 0,1	1,4 +/- 0,5
CraCryV9	1,6 +/- 0,2	1,6 +/- 0,2	1,9 +/- 0,1

Mittels Immunodetektion wurden die Varianten CraCryV3 und CraCryV9 untersucht sowie die Massen der Konstrukte und der Spaltprodukte analysiert. Für beide Konstrukte zeigt die Signalbande des mCherrys die erwartete Molekularmasse von 89,9 kDa (**Anhang Abbildung 47 A**). GFP wurde jedoch unvollständig durch den P2A-Tag von dem Konstrukt abgespalten (**Anhang Abbildung 47 A**). Die mCherry- und Tubulin-Signale wurden quantifiziert (**Anhang Abbildung 47 B**). Variante

CraCryV3 zeigt wie die CraCryV9 Variante (**Anhang Abbildung 47 B**) unter Blaulicht und unter Rotlicht (**Anhang Abbildung 47 B**) ein ähnliches Proteinlevel. Interessanterweise zeigt die CraCryV3 als auch die CraCryV9 Variante kein signifikantes Schaltverhalten (**Anhang Abbildung 47 B**) wie in den Fluoreszenzmessungen. Basierend auf den Fluoreszenzmessungen wird im Folgenden mit der CraCryV3 Variante weitergearbeitet, da der Westernblot vor allem zur quantitativen Überprüfung der Konstrukte diene.

### 5.4.3 Kinetische Untersuchungen der CraCry Variante drei (CraCryV3)

Die CraCryV3 Variante zeigt das beste Schaltverhalten zwischen blauem und rotem Licht im psd-Modul in den Fluoreszenzmessungen. Änderungen des Proteinlevels wurden über die Zeit beobachtet (**Abbildung 34 A**). Unter Blaulicht erfolgt eine stetige Zunahme des Proteinlevels innerhalb von zwei Stunden auf das 3,4 fache des Startlevels (**Abbildung 34 A**). Die Zunahme des Proteinlevels unter Blaulicht läuft für die CraCry3 Variante schneller ab als der Abbau unter Rotlicht (**Abbildung 34 A**). Nach zwei Stunden ist das Proteinlevel unter Rotlicht um etwa die Hälfte gesunken (**Abbildung 34 A**). Zur Bestimmung von kinetischen Parametern ist es nötig, die Proteintranslation zu stoppen, damit das abgebaute Protein nicht weiterhin produziert wird. Mittels Cycloheximid wurde die Proteintranslation gestoppt und die Proteindegradation unter Rotlicht über die Zeit von zwei Stunden beobachtet (**Abbildung 34 B**).



**Abbildung 34:** Kinetiken der CraCryV3 Variante. **A:** Nach dreistündiger Inkubation unter Blaulicht/Rotlicht (blau= 465 nm, rot = 630 nm, jeweils  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ), wurde die Beleuchtung geändert und über zwei Stunden die Zunahmen bzw. die Abnahme beobachtet. Unter Blaulicht lässt sich nach zwei Stunden eine Zunahme um den Faktor 3,4 beobachten. Der Faktor für Abnahme unter Rotlicht nach zwei Stunden beträgt 2,1. **B:** Kinetik der CraCryV3 Variante unter Rotlicht nach Inhibierung der Translation durch Cycloheximid. Die Verringerung des Proteinlevels über 2 Stunden erfolgt auch um den Faktor 2,2. Der Anstieg nach 30 min ist auf die Reifung des mCherry-Fluorophores zurückzuführen.

Über diese Zeitspanne wurde das Proteinlevel um den Faktor 2,2 reduziert. Der beobachtete Anstieg nach 30 min ist auf die Reifung des mCherrys zurückzuführen. Aufgrund dieses Anstiegs ist es nicht möglich aus den Daten eine exponentielle Zerfallsfunktion berechnen. Um trotzdem die

## 5 Ergebnisse

Halbwertszeiten abzuschätzen, wurde ein exponentieller Zerfall von CraCryV3 unter Rotlicht ohne Cycloheximid (**Abbildung 34 A**) ermittelt (**Anhang Abbildung 48**). Die Halbwertszeit wurde durch Gleichung (2) (siehe 5.1.3) erhalten und beträgt 71,5 min (+/- 20,7 min). Eine ähnliche Halbwertszeit lässt sich aus der Cycloheximid Messung abschätzen (**Abbildung 34 B**). Die Proteindegradation der CraCryV3 Variante unter Rotlicht ist um den Faktor 3,5 langsamer als der Abbau des psd-Moduls der ersten Generation (*AtLOV2*) unter Blaulicht.<sup>29</sup> Mit der CraCryV3 Variante wurde die erste rotlichtsensitive Variante des photosensitiven Degronmoduls entwickelt, welche einen Schalfaktor von etwa zwei besitzt. Der gleichzeitige Einfluss von rotem und blauem Licht ist mit der reinen Blaulichtbestrahlung zu vergleichen.

## 6 Diskussion

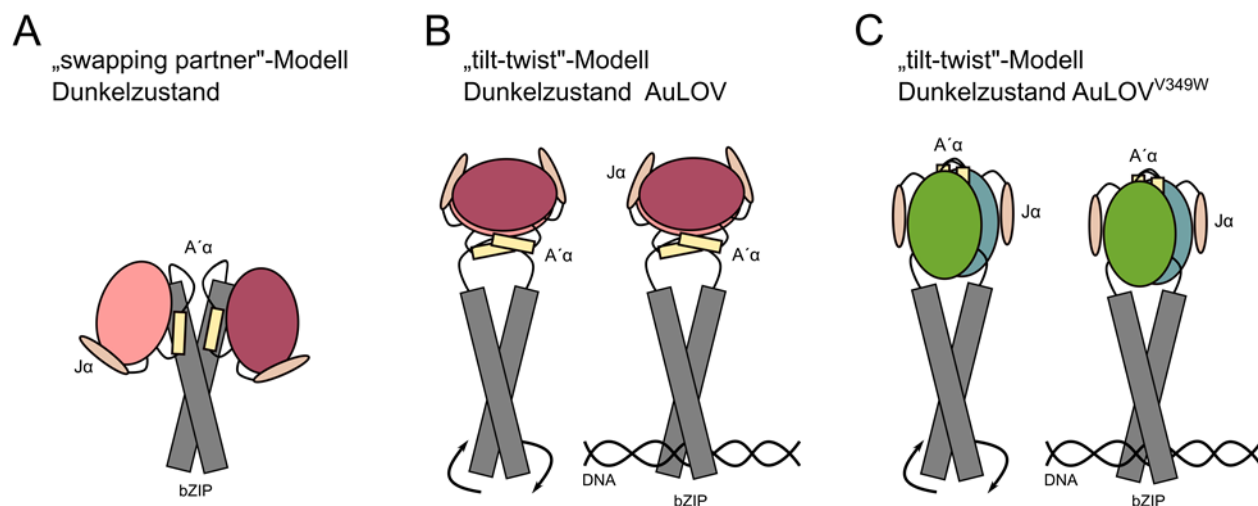
Die Diskussion befasst sich im ersten Teil mit der neuartigen Dimeranordnung in der AuLOV-Domäne und seiner physiologischen Relevanz. Im zweiten Teil der Diskussion wird das divergente Photoschaltverhalten der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante aufgegriffen. Als drittes befasst sich die Diskussion mit der intrinsischen Degradation der AuLOV-Domäne im psd-Modul. Anschließend wird als viertes das optogenetische Modul AuPAC und die Destabilisierungssequenz AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> als Applikationen in der Optogenetik genauer beleuchtet. Abschließend befasst sich die Diskussion im fünften Teil mit CraCry und seinem Potential als rotlichtbasierte optogenetische Applikation.

### 6.1 Physiologische Bedeutung der neuen Dimerinteraktionsfläche der AuLOV-Domäne

In dieser Arbeit wurde eine alternative Dimeranordnung für die AuLOV-Domäne gefunden. Diese neue Dimeranordnung zeigt eine Involvierung der A'- $\alpha$ -Helices in die Dimerinteraktionsfläche. Welche Bedeutung hat diese neue Dimerinteraktionsfläche und wie fügt sich diese in die Modelle der DNA-Bindung des Aureochroms 1a aus *P. tricornutum*? Für die DNA-Bindung sind unabhängig voneinander zwei Modelle basierend auf den Strukturen des Dunkel- und Lichtzustandes entwickelt worden. Das *swapping partner*-Modell wurde von Heintz und Schlichting postuliert. In diesem Modell liegt die AuLOV-Domäne im Dunkelzustand als Monomer vor und lagert sich an bZIP an, welches als Dimer an die DNA angelagert ist (**Abbildung 35 A**) und so die DNA-Bindung inhibieren.<sup>48</sup> Erst durch die Anregung der AuLOV-Domäne mit Blaulicht dimerisiert diese, wodurch die Affinität von bZIP zur DNA erhöht wird.<sup>48</sup> Ein weiteres Modell, das *tilt-twist*-Modell, wurde von Banerjee *et al.* entworfen.<sup>33,63</sup> Hier liegt AuLOV im Dunkeln als Dimer vor, wodurch die bZIP-Domäne eine höhere Flexibilität besitzt, was im Dunkeln zur DNA-Bindung führt (**Abbildung 35 B**).<sup>33,63</sup> Durch die Anregung mit Blaulicht kommt es zur Elongation des bZIPs und zur verbesserten DNA-Bindung.<sup>33,63</sup> Wird doppelsträngige DNA gebunden, kommt es zur Verdrillung der DNA, was eine Verdrehung des bZIP zur Folge hat.<sup>33,63</sup> In diesem Modell wurde das Expressionslevel vom Aureochrom 1a miteinbezogen. Das Aureochrom 1a Gen wird unabhängig von dem Belichtungszustand im zirkadianen Rhythmus transkribiert.<sup>33</sup> Die Dimerstrukturen der AuLOV-Mutanten (AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup>) liefern eine weitere Domänenanordnung der AuLOV-Domäne im Dunkelzustand. Die Analyse der Dimerisierungsfläche der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante ergab, dass die Struktur thermodynamisch etwas begünstigter ist als der Dunkelzustand der AuLOV-Domäne. Des Weiteren



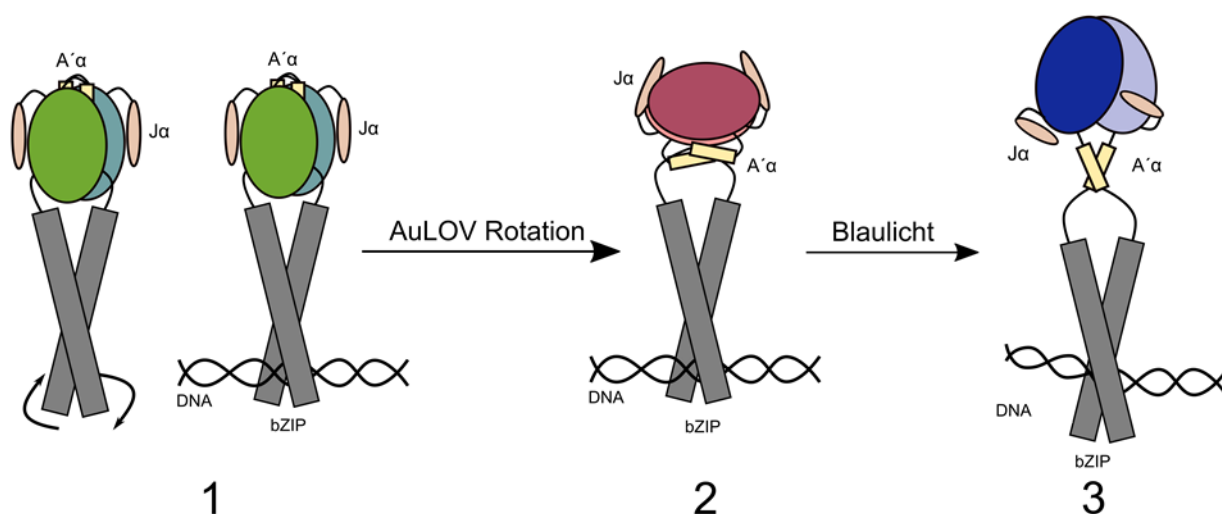
konnte durch SEC-Experimente gezeigt werden, dass die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante sowohl im Licht- als auch im Dunkelnzustand als Dimer eluiert.



**Abbildung 35:** DNA-Bindungsmodelle des Aureochrom 1a aus *P. tricornutum* im Dunkelnzustand. **A:** Im *swapping partner*-Modell von Heintz und Schlichting liegt das Aureochrom 1a als Dimer vor, die Dimerisierung erfolgt nicht über die AuLOV-Domäne, sondern über den bZIP.<sup>48</sup> Die AuLOV liegt als Monomer vor und lagert sich an bZIP an, es erfolgt keine DNA Bindung.<sup>48,63</sup> **B:** Die AuLOV-Domäne, im *tilt-twist*-Modell, liegt im Dunkelnzustand als Dimer vor. Dies gibt bZIP Flexibilität um lichtunabhängig an DNA zu binden. **C:** Die Dimerstruktur der Mutanten AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup> unterstützen das *tilt-twist*-Modell. Durch die fast parallele Anordnung der A'-α-Helices ist die Flexibilität der bZIP-Domäne vor der DNA-Bindung begünstigt, im Vergleich zur der bekannt Dunkelzustands Struktur der AuLOV von Banerjee et al.<sup>33,63</sup>

Die AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante zeigt die gleichen strukturellen Eigenschaften, jedoch eluiert sie im Dunkelnzustand als Monomer. Aufgrund des Elutionsverhaltens der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante und der konzentrationsabhängigen Dimerisierung von AuLOV,<sup>45</sup> ist anzunehmen, dass die AuLOV im Dunkeln bei hohen Konzentrationen als Dimer vorliegt, was gegen das *swapping partner*-Modell spricht. Die dimeren Strukturen der Mutanten (AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup>) würden mit der parallelen Anordnung der A'-α-Helices eine Flexibilität der bZIP-Domäne im nicht DNA-gebunden Zustand wie von Banerjee et al. beschrieben begünstigen (**Abbildung 35 C**). Anschließend würde es zur DNA-Bindung nach dem *tilt-twist*-Modell kommen. Die Anordnung der Dimerisierungsfläche der AuLOV-Domäne erscheint sehr heterogen; daher stellt sich die Frage nach dem wahren Dunkeldimer. Die beschriebene Anordnung der Sekundärstrukturelementen der AuLOV-Mutanten wurden auch in der LOV-Domäne des Aureochrom 1a von *Ochromonas danica* gefunden<sup>34</sup>; bei *O. danica* handelt es sich um eine Alge der Familie *Chrysophyta* (Goldalgen).<sup>125</sup> Die Ähnlichkeit zu der Struktur von *O. danica* zeigt, dass es sich bei der Struktur der AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup> Mutante anscheinend auch um ein physiologisch relevantes Dimer handelt. Weitere Untersuchungen von Banerjee et al. haben gezeigt, dass das bZIP-AuLOV Konstrukt aus Aureochrom 1a unabhängig des

Belichtungszustandes als Dimer in SEC-Experimenten eluiert.<sup>33</sup> Unter Einbeziehung der Strukturen der AuLOV-Mutanten (AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup>) lässt sich ein hypothetisches Modell zur DNA-Bindung von Aureochrom 1a basierend auf dem *tilt-twist*-Modell erstellen (**Abbildung 36**). Dieses Modell besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt liegt das Aureochrom in Dunkelheit als Dimer vor (**Abbildung 36**). Die AuLOV-Domäne nimmt die Dimerstruktur der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante ein. Durch diese Dimerstruktur besitzt die bZIP-Domäne eine erhöhte Flexibilität und kann so an DNA binden (**Abbildung 36**). Die DNA-Bindung begünstigt eine Verdrehung der Dimerisierungsfläche der AuLOV-Domäne im zweiten Schritt (**Abbildung 36**); diese nimmt den von *Banerjee et al.*<sup>36</sup> beschriebenen Dunkelzustand ein.



**Abbildung 36:** Hypothetisches Modell zur DNA-Bindung des Aureochrom 1a, in drei Schritten, basierend auf den *tilt-twist*-Modell unter Einbeziehung der neuen Dimeranordnung der Mutanten (AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup>). In Schritt 1 liegt das Aureochrom im Dunkelzustand als Dimer, nicht an DNA gebunden, vor. Die AuLOV-Domäne nimmt die Dimerstruktur der Mutanten (AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup>) ein. Die bZIP-Domäne ist flexibel und kann so an die DNA binden. Durch die Bindung an die DNA kommt es zu einer Verdrehung der Dimerisierungsfläche der AuLOV-Domäne im Schritt 2. Die AuLOV-Domäne nimmt die von *Banerjee et al.* beschriebene Dimeranordnung an. Durch Blaulichtbeleuchtung geht die AuLOV-Domäne im Schritt 3 in das Lichtdimer über und es kommt zur Verdrillung der DNA und zur Verdrehung des bZIPs wie im *tilt-twist*-Modell beschrieben.<sup>33,63</sup>

Im dritten Schritt kommt es durch Blaulichtbeleuchtung zur Ausbildung des Lichtdimers und zur Verdrillung der DNA, sowie zur Verdrehung des bZIP im *tilt-twist*-Modell (**Abbildung 36**).<sup>33,63</sup> Aus diesem Dimer des Dunkelzustandes ist der Übergang zu dem Lichtdimer mit einer weniger strukturellen Reorganisation verbunden, da sich die A'α-Helices nicht mehr in der Dimerisierungsfläche eingebettet befinden wie bei der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante. Diese modifizierte Version des *tilt-twist*-Modells berücksichtigt die beiden bekannten Dimerstrukturen im Dunkelzustand; die von *Banerjee et al.* beschriebene Dunkelstruktur<sup>36</sup> und die der AuLOV-Mutanten (AuLOV<sup>V349W</sup> und AuLOV<sup>V254M</sup>) aus dieser Arbeit. Weiterhin berücksichtigt das Modell die

Heterogenität der Ausrichtung der Dimerisierungsfläche in den LOV-Domänen des Aureochroms und spricht beiden Dimeren im Dunkelzustand eine Bedeutung zu. Molekulardynamische Simulationen, wie sie zur Erstellung des *tilt-twist*-Modells genutzt wurden,<sup>33</sup> könnten mit Hilfe der Struktur der AuLOV-Mutanten dieses Modell verifizieren und einen tieferen Einblick in die Struktur der Dimerisierungsfläche der LOV-Domänen in den Aureochromen geben.

## 6.2 Das divergente Photoschaltverhalten der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante

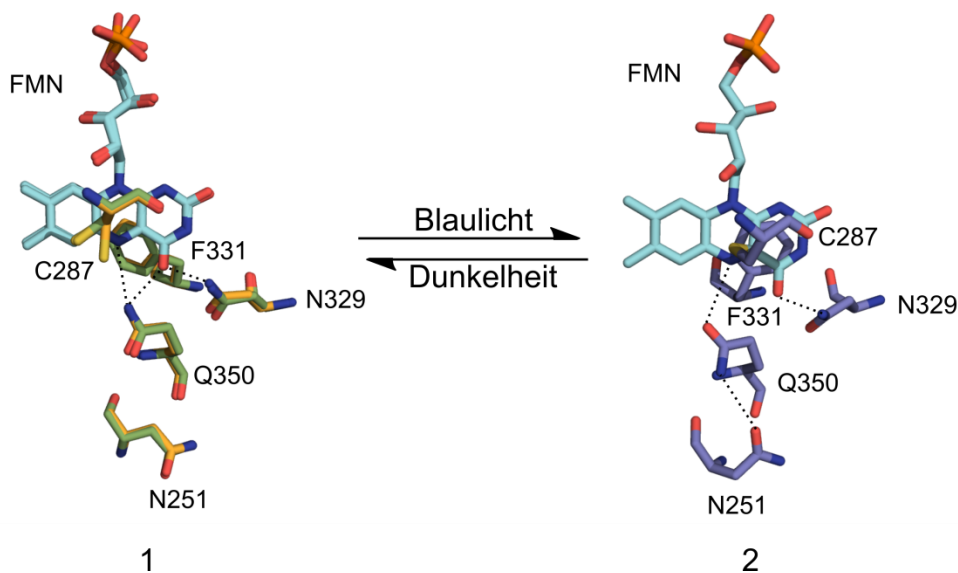
Die spektroskopischen Untersuchungen der AuLOV-Mutanten zeigten ein divergentes Verhalten der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante bezüglich des photochemischen Verhaltens. Die Ausbildung des C4(a)-Addukts, der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante und der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante ist wesentlich langsamer im Vergleich zum Wildtyp und der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante. Dies betrifft auch den Zerfall des C4(a)-Addukts, da die Dunkelreversion der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante in dem gewählten experimentellen Aufbau nicht detektierbar war. Dies deutet auf eine besondere Stellung des Tryptophans W349 hin, welches anscheinend einen Einfluss auf den Photozyklus nimmt. In der Literatur bekommt die Deprotonierung des N5-Stickstoffes des Flavins eine besondere Bedeutung zugeschrieben, da dieser als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt angesehen wird.<sup>38,126</sup> Weiterhin konnte aufgrund seiner Basizität Imidazol als Katalysator für einen schnelleren Zerfall des C4(a)-Addukts identifiziert werden.<sup>38,44</sup> Änderungen im Wasserstoffbrückennetzwerk sowie die Zugänglichkeit des Flavins für andere Moleküle, wie zum Beispiel Wasser oder andere Ionen, spielen eine Rolle für die Kinetik der LOV-Domänen.<sup>38,126</sup> Um die Zugänglichkeit des FMNs in der AuLOV-Domäne abzuschätzen und eine eventuelle Verkleinerung der FMN-Bindetasche durch die V349W-Mutation zu erkennen, wurde die Größe der FMN-Bindetasche mit dem CASTp 3.0 Server bestimmt.<sup>127</sup>

**Tabelle 28:** Lösungsmittelzugänglichkeit (*solvent accessibility (SA)*) der FMN-Bindetasche in den Strukturen der AuLOV-Domänen. Die Bestimmung der Volumen erfolgte mit dem CASTp 3.0 Server.<sup>127</sup>

		Volumen (SA)
		Kette A / Kette B
AuLOV	Lichtzustand (5dkl)	122,6 / 93,6
	Dunkelzustand (5a8b)	130,6 / 124,8
AuLOV <sup>V254M</sup>	Dunkelzustand	126,9 / 126,9
AuLOV <sup>V349W</sup>	Dunkelzustand	131,3 / 128,4

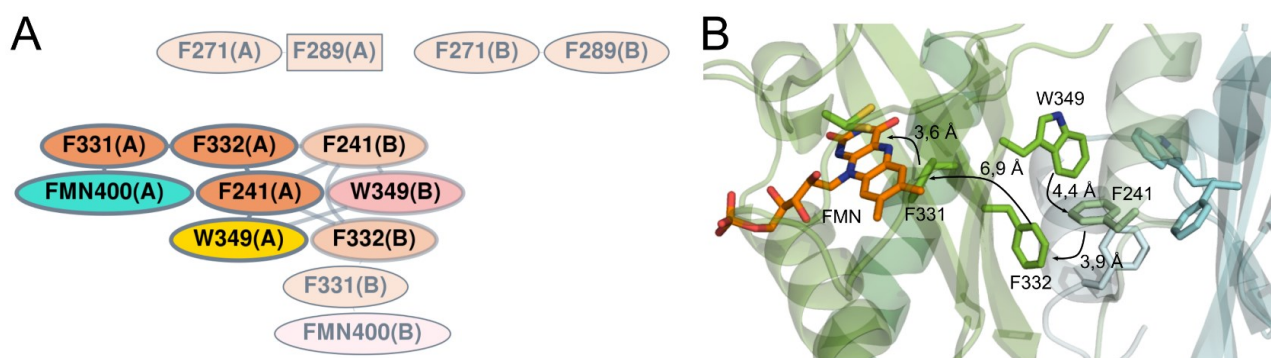
Dies erfolgte auch für den Wildtyp im Licht- (5dkl)<sup>48</sup> und im Dunkelizustand (5a8b)<sup>33</sup> sowie für die AuLOV<sup>V254M</sup> und AuLOV<sup>V349W</sup> Mutante. In Tabelle 28 sind die abgeschätzten Volumina aufgeführt. Nur der Lichtzustand der AuLOV-Domäne zeigt einen Unterschied zu dem Dunkelizustand, wohingegen die Mutanten (AuLOV<sup>V254M</sup> und AuLOV<sup>V349W</sup>) als auch der Dunkelizustand der AuLOV-Domäne keinen großen Unterschied in der Größe der Cofaktortasche aufweisen. Daraus lässt sich schließen, dass eine Verkleinerung der FMN-Bindetasche aufgrund von strukturellen Veränderungen und ein damit verbundener schlechterer Zugang des FMNs nicht der Grund für das divergente Photoschaltverhalten der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante ist. Um dies abschließend zu klären, wäre eine Struktur der Mutanten im Lichtzustand von Nöten.

Für die LOV-Domäne des Aureochrom 1a aus *O. danicia* (OdLOV), welche eine strukturelle Identität von 95 % mit der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante besitzt, wurden zwei verschiedene Lichtzustände beschrieben; der „Swing“ und der „Flip“ Zustand.<sup>34</sup> Der „Flip“ Zustand bezieht den N5-Stickstoff des FMNs für die Ausbildung des C4(a)-Addukts mit ein,<sup>34</sup> wohingegen es im „Swing“ Zustand zu keiner Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Isoalloxazin-Rings des FMNs kommt. Dieser wurde als Übergangszustand zwischen Dunkel- und Lichtzustand postuliert.<sup>34</sup>



**Abbildung 37:** Mögliches Wasserstoffbrückennetzwerk im Dunkelizustand (1) der AuLOV-Domäne (grün) und des AuLOV<sup>V349W</sup> (gelb). Die Beleuchtung mit Blaulicht führt zu einer Veränderung des Wasserstoffbrückennetzwerks in der AuLOV-Domäne im Lichtzustand (2). Die Länge der Wasserstoffbrücken, in der AuLOV-Domäne liegt, zwischen 3,0 und 3,7 Å und ist damit relativ lang für Wasserstoffbrücken (normalerweise 1,5 bis 2,5 Å).<sup>128</sup> Die Netzwerke wurden über den Vergleich der AuLOV Strukturen der LOV-Domäne aus dem Aureochrom 1a von *O. danicia* gefunden.<sup>34</sup> Zusätzlich zeigt das Phenylalanin 331 eine strukturelle Änderung, in dem es vollständig unter den Isoalloxazin-Rings des FMNs klappt.

Im Dunkelzustand der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante und der AuLOV-Domäne (5a8b)<sup>36</sup> konnte das Wasserstoffbrückennetzwerk, wie von *Kalvaitis et al.* beschrieben identifiziert werden (**Abbildung 37**).<sup>34</sup> Der Lichtzustand weist das Wasserstoffbrückennetzwerk des „Flip“ Zustandes von *Kalvaitis et al.* auf (**Abbildung 37**). Die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante zeigt hier keine Abweichung von dem Dunkelzustand (5a8b)<sup>36</sup> (**Abbildung 37**). Der Lichtzustand der AuLOV-Domäne (5dcl)<sup>48</sup> zeigt die von dem „Flip“ Zustand bekannte Anordnung der *OdLOV*-Domäne (**Abbildung 37**). Es lässt sich postulieren, dass die AuLOV-Domäne wie auch die *OdLOV*-Domäne einen Übergangszustand wie den von *Kalvaitis et al.* beschrieben „Swing“ Zustand<sup>34</sup> ausbilden kann, jedoch fehlt der strukturelle Beweis für die AuLOV-Domäne. Interessanterweise zeigt das Phenylalanin 331 (F331) in der AuLOV-Domäne auch eine strukturelle Veränderung bei der Ausbildung des Lichtzustandes, in dem es eine andere Rotamer-Konformation einnimmt und unter das FMN-Chromophor klappt (**Abbildung 37**). Sowohl im Dunkel- als auch im Lichtzustand liegen die Abstände in der Größenordnung für aromatische Interaktionen bis ca. 6,5 Å,<sup>129</sup> sodass zum Beispiel eine  $\pi$ - $\pi$ -Interaktion denkbar wäre. Das Phenylalanin F331 liegt in direkter Nachbarschaft zu dem Phenylalanin F332, welches in der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante in den hydrophoben Kern eingebunden ist und so mit dem Tryptophan W349 über hydrophobe und aromatische Interaktion wechselwirken kann. Für die Interaktion zwischen dem hydrophoben Kern und FMN liegen keine experimentellen Daten vor. Mit dem eMAP Server lässt sich eine Vorhersagen bezüglich der Elektronentransferwege zwischen Tryptophan W349 und FMN treffen (**Abbildung 38 A, B**).<sup>130</sup> Dieser hypothetische Elektronentransferweg schließt das Phenylalanin 331 mit ein, welches in der Lichtstruktur eine andere Konformation einnimmt (**Abbildung 37, Abbildung 38 A, B**).



**Abbildung 38:** Hypothetischer Elektronentransferweg vom Tryptophan W349 zum FMN in der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante. **A:** Vorhergesagte Elektronentransferkarte des eMAP-Servers.<sup>130</sup> **B:** Übertragen des vorhergesagten Weges auf die Struktur der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante. Die Pfeile stellen den hypothetischen Weg der Elektronen dar.

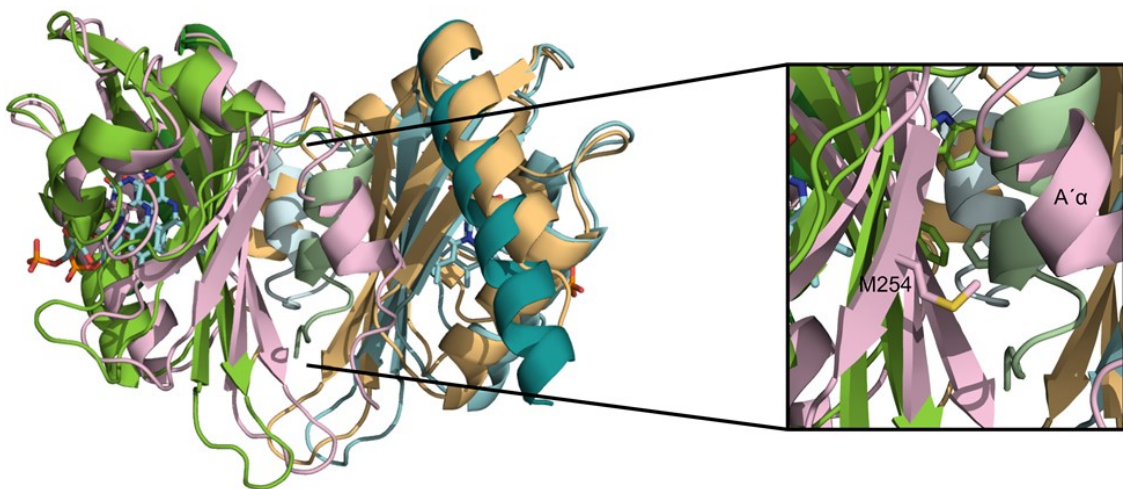
Über diese hypothetische Elektronentransferkette würde es zur erneuten Anregung des FMNs kommen, nachdem das C4(a)-Addukt in der Dunkelreversion zerfallen ist. Das angeregte FMN bildet erneut eine Thioetherbindung aus und die AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante bleibt im Lichtzustand. Die Bereitstellung der Elektronen erfolgt über das angeregte  $\pi$ -Elektronensystem des hydrophoben Kerns. Dies führt zu einer langsameren Ausbildung des C4(a)-Addukts in der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante, da der hydrophobe Kern und der FMN-Cofaktor bei der Photonenabsorption in Konkurrenz zueinanderstehen. Dieses Modell zeigt, dass es sich bei der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante um ein photochemisch sehr komplexes System handelt und sich das experimentell beobachtete Photoschaltverhalten mit dem *status quo* der experimentellen Daten nicht klären lässt. Aufgrund der strukturellen Charakterisierung der OdLOV-Domäne von *Kalvaitis et al.* und dem Vergleichen mit den AuLOV-Strukturen, lässt sich ein Photozyklus über den „Swing“ Zustand in den „Flip“ für die AuLOV-Domäne postulieren. Dies jedoch liefert keine Erklärung für das Photoschaltverhalten der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante. Auch die Zugänglichkeit des FMN-Cofaktors für andere Moleküle, was in anderen LOV-Domänen das Photoschaltverhalten beeinflusst, liefert hier keine Erklärung.<sup>38,126</sup> Abschließend lässt sich über AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante sagen, dass es sich um eine photochemisch komplexe Version der AuLOV-Domäne handelt und der Einfluss des Tryptophan W349 auf den Photozyklus bisher nicht abschließend klären lässt.

### 6.3 Einordnung der intrinsischen Degradation der AuLOV-Domäne

Die AuLOV-Domäne hat eine intrinsische Degradation, welche in den Fluoreszenzreporterexperimenten mit inaktiven cODC1-Degron gezeigt werden konnte. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass es sich um eine Ubiquitin-abhängige Degradation handelt. Interessanterweise wurde diese intrinsische Degradation für AtLOV und andere LOV-Domänen, die im photosensitiven Degronmodul getestet wurden, nicht beobachtet.<sup>6,28,29</sup> Dies deutet auf eine Aureochrom-spezifische Funktion der AuLOV-Domäne hin. Bei den Aureochromen handelte es sich um Blaulichtphotorezeptoren, die bZIP als N-terminale Effektor-domäne und eine LOV-Domäne als Sensordomäne besitzen und so eine inverse Domänenanordnung zu anderen Proteinen mit LOV-Domänen besitzen.<sup>33,45</sup> Die Funktion des Aureochroms 1a aus *P. tricornutum* ist auf struktureller Ebene geklärt,<sup>33,48</sup> jedoch ist sie auf der physiologischer Ebene weitestgehend unerforscht.<sup>131</sup> Von *Huysman et al.* wurde beschrieben, dass Aureochromen die Expression des Diatom-spezifischen Proteins Cyclin 2 steuern<sup>132</sup> und im Zellzyklus sowie der Zellteilung involviert sind.<sup>133</sup> Von *Schellenberger Costa et al.* wurde eine Involvierung des Aureochroms in die Anpassung an die

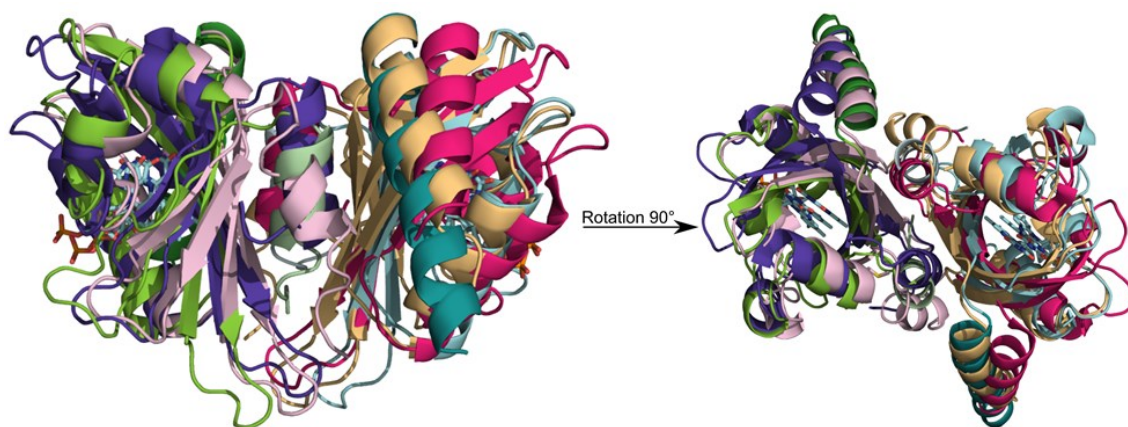


Lichtverhältnisse (Photoaklimatation) und die Photoprotektion in *P. tricornutum* vorgeschlagen.<sup>46</sup> Die Involvierung der Aureochrome in die Anpassung an die Lichtverhältnisse unter Blaulicht wurde auch von Mann *et al.* bekräftigt.<sup>131</sup> Interessanterweise wurde auch eine Anpassung an Rotlichtbedingungen von Mann *et al.* beschrieben, welche nicht so stark wie unter Blaulicht verlief.<sup>131</sup> Es wurde postuliert, dass Aureochrom 1a aus *P. tricornutum* eine blaulichtunabhängige Funktion besitzt, welche aber noch aufgedeckt werden muss.<sup>131</sup> Unter Annahme dieser Hypothese könnte die intrinsische Degradation der AuLOV-Domäne, die in *S. cerevisiae* beobachtet wurde diese Funktion sein. Unter Blaulicht würde es zu einem erhöhten AuLOV-Domäne Level in *S. cerevisiae* kommen. Jedoch lässt sich der intrinsischen Ubiquitin-abhängigen Degradation zurzeit keine physiologische Relevanz zusprechen, da diese bis jetzt nur in *S. cerevisiae* beobachtet wurde. Daher wäre es von Interesse, jene auch in *P. tricornutum* nachzuweisen. So lässt sich in *P. tricornutum* auf der *in vivo* Eben keine Erklärung für dieses Verhalten finden. Ein Vergleich der *in vitro* Daten mit den *in vivo* Daten zeigt ein divergentes Verhalten. Die Mutanten (AuLOV<sup>V349W</sup>, AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>) liegen bei hohen Konzentrationen im Dunkeln sowie im Lichtzustand als Dimer vor und besitzen ein sehr langsames Photoschaltverhalten im Vergleich zum Wildtyp und der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante. Die Doppelmutante AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> ist interessanterweise die Mutante, die in den *in vivo* Experimenten das größte Schaltverhalten zeigt. Durch die Verdünnungsreihe dieser Doppelmutante AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> wurde ersichtlich, dass sie im Dunkeln bei niedriger Konzentration als Monomer vorliegt.



**Abbildung 39:** Superposition der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante (Kette A = grün, Kette B = Cyan) und AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante (Kette A = pink, Kette B = sandfarben) zeigt eine gleiche Dimeranordnung der beiden Varianten. Der M254 Rest interagiert mit der A'α-Helix und stabilisiert die Dimerisierungsfläche.

Dies lässt darauf schließen, dass auch bei niedrigen Proteinkonzentrationen *in vivo* im Dunkelzustand die Doppelmutante als Monomer vorliegt. Durch die Struktur der AuLOV<sup>V349W</sup>- und AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante lässt sich eine Heterogenität der Dimerisierungsfläche der AuLOV-Domäne erkennen, da sich die neuen Strukturen von den bekannten Strukturen der AuLOV-Domäne unterscheiden.<sup>36,48</sup> Die Strukturen dieser Mutanten weisen beide eine hohe Strukturidentität zu der LOV-Domäne des Aureochroms 1a von *O. danica* auf.<sup>34</sup> In der dimeren Struktur der AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante interagiert der M254 Rest mit der A'- $\alpha$ -Helix (**Abbildung 39**) und stabilisiert die Dimerisierungsfläche. Durch die Superposition mit der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante wird ersichtlich, dass auch hier der M254 Rest mit der A'- $\alpha$ -Helix interagieren würde (**Abbildung 39**). Es ist wahrscheinlich, dass sowohl der hydrophobe Kern als auch der M254 Rest eine Stabilisierung des Lichtdimers begünstigen, da die LOV-Domäne des Aureochroms 1a von *Ochromonas danica* im Lichtzustand (6i22)<sup>34</sup> eine ähnliche Dimeranordnung wie die AuLOV<sup>V349W</sup>- und AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante aufweist (**Abbildung 40**). Daher lässt sich für den Lichtzustand der AuLOV-Mutanten sowie für die Doppelmutante die gleiche Dimeranordnung wie in der *Od*AuLOV-Domäne (6i22) postulieren.<sup>34</sup>



**Abbildung 40:** Superposition der AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante (Kette A = grün, Kette B = Cyan), AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante (Kette A = pink, Kette B = sandfarben) und der LOV-Domäne des Aureochroms 1a von *O. danica* im Lichtzustand (6i22)<sup>34</sup> (Kette A = violett, Kette B = Magenta) zeigen eine ähnliche Anordnung in der Dimerstruktur.

Die strukturbasierten Daten deuteten auf eine Heterogenität in den Dimeren der AuLOV-Domäne im Dunkelzustand hin. Verstärkt wird diese Annahme durch die *in vitro* Experimente mit mCherry-AuLOV-cODC1, welche im Widerspruch zu den *in vitro* Daten der AuLOV-Mutanten stehen. Als eine Erklärung für das *in vivo* Verhalten lässt sich eine vorübergehende Homogenität der gebildeten Dimere unter Blaulicht postulieren. Diese vorübergehende Homogenität lässt sich durch die blaulichtinduzierte Dimerisierung erreichen. Diese Homogenität hat für den Proteinabbau durch die

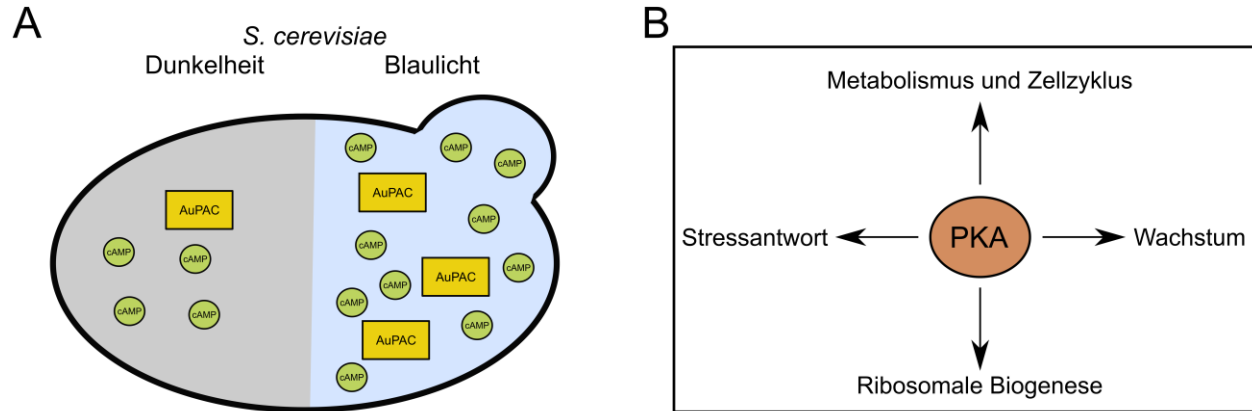


intrinsische Degradation von AuLOV-cODC<sup>CA</sup> eine Bedeutung. So führt eine Erhöhung der Homogenität dazu, dass aufgrund der Verringerung der Konformationswechsel weniger Angriffsfläche für die Ubiquitinproteinligase bieten und so nicht durch den Ubiquitin-abhängigen Abbauweg abgebaut werden. So zeigen die Mutanten AuLOV<sup>V254M</sup>, AuLOV<sup>V349W</sup> und die Doppelmutante gegenüber dem Wildtyp ein besseres Schaltverhalten in den *in vivo* Experimenten aufgrund einer höheren Homogenität im Lichtzustand. In AuPAC liegt auch bPAC im aktiven Zustand als Dimer vor,<sup>57</sup> was diesen Effekt der Homogenisierung verstärken könnte.

#### 6.4 AuPAC, eine AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> basierte Applikation in *S. cerevisiae*

Die Fusion von AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup>, als Destabilisierungssequenz im Dunkeln, an bPAC führt zu der neuartigen photoaktivierbaren Adenylatcyclase AuPAC, als optogenetische Anwendung. In diesem Konstrukt ist die Adenylatcyclase C- und N-terminal mit einem Blaulichtphotorezeptor fusioniert (BLUF-AC-AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup>). Als Anwendung für AuPAC wurde auf eine blaulichtabhängige Steuerung des cAMP-Levels in *S. cerevisiae* anvisiert. Mittels Wachstumstests konnte gezeigt werden, dass AuPAC ein physiologisch relevantes cAMP-Level produziert, da der AuPAC Stamm, in dem die natürliche Adenylatcyclase Cyr1 durch AuPAC ausgetauscht wurde, ein blaulichtabhängiges Wachstumsverhalten zeigt. Experimentell konnte eine Zunahme des Proteinlevels und des cAMP-Levels unter Blaulicht für den *S. cerevisiae* Stamm mit AuPAC gezeigt werden (**Abbildung 41 A**). Interessanterweise wurde unter vollständigem Lichtausschluss kein Wachstum beobachtet. Eine Erklärung dafür ist der Übergang von der Proteinkinase A in die Ruhephase wie von *de Virgilio* beschrieben.<sup>120</sup> Wie erwartet wurde unter moderaten Blaulichtintensitäten ein gesteigertes Wachstum beobachtet. Höherer Blaulichtintensität führten zu einem verminderten Wachstum, sodass das Wachstum nicht mit dem AuPAC Proteinlevel korreliert. Dieses verminderte Wachstum kann auf die von *Bolte et al.* beschriebene PKA-abhängige Hemmung des *anaphase-promoting* Komplexes zurückgeführt werden.<sup>120,121</sup> Die Bestimmung des cAMP-Levels in *S. cerevisiae* Stämmen mit bPAC unter Kontrolle des starken *ADHI* und des schwachen *CYCI* Promotors lieferte keine eindeutige Korrelation zwischen Wachstum und cAMP-Level. Eine eindeutige Erklärung hierfür ist bisher nicht möglich. Es ist zu bedenken, dass die Adenylatcyclase unter der Kontrolle von zwei Blaulichtphotorezeptoren steht. Bei der BLUF-Domäne, welche der photoaktive Teil von bPAC ist, handelt es sich um eine FAD-enthalten Photorezeptor, der die cAMP-Produktion von bPAC in Abhängigkeit von Blaulicht kontrolliert.<sup>54-56</sup> Über das Zusammenspiel der BLUF und der AuLOV-Domäne in AuPAC ist wenig bekannt, sodass über gegenseitigen Einfluss der

beiden Photorezeptoren nur spekuliert werden kann. Auch die Hefezelle an sich kann ein Grund des divergenten cAMP-Levels sein, möglich wäre eine unterschiedlich starke Adaption der Zelle an den Lichtzustand.



**Abbildung 41:** Die blaublichtsensitive Adenylatcyclase AuPAC in *S. cerevisiae*. **A:** Unter Blaulicht ist das Proteinlevel von AuPAC höher als in Dunkelheit. Entsprechend ist das cAMP-Level aufgrund der photoaktivierbaren Adenylatcyclasenaktivität und des hohen Proteinlevels von AuPAC unter Blaulicht wesentlich höher als in Dunkelheit. **B:** AuPAC nimmt direkten Einfluss auf die Proteinkinase A in *S. cerevisiae*, so können relevante Zellfunktionen gesteuert werden.<sup>120</sup>

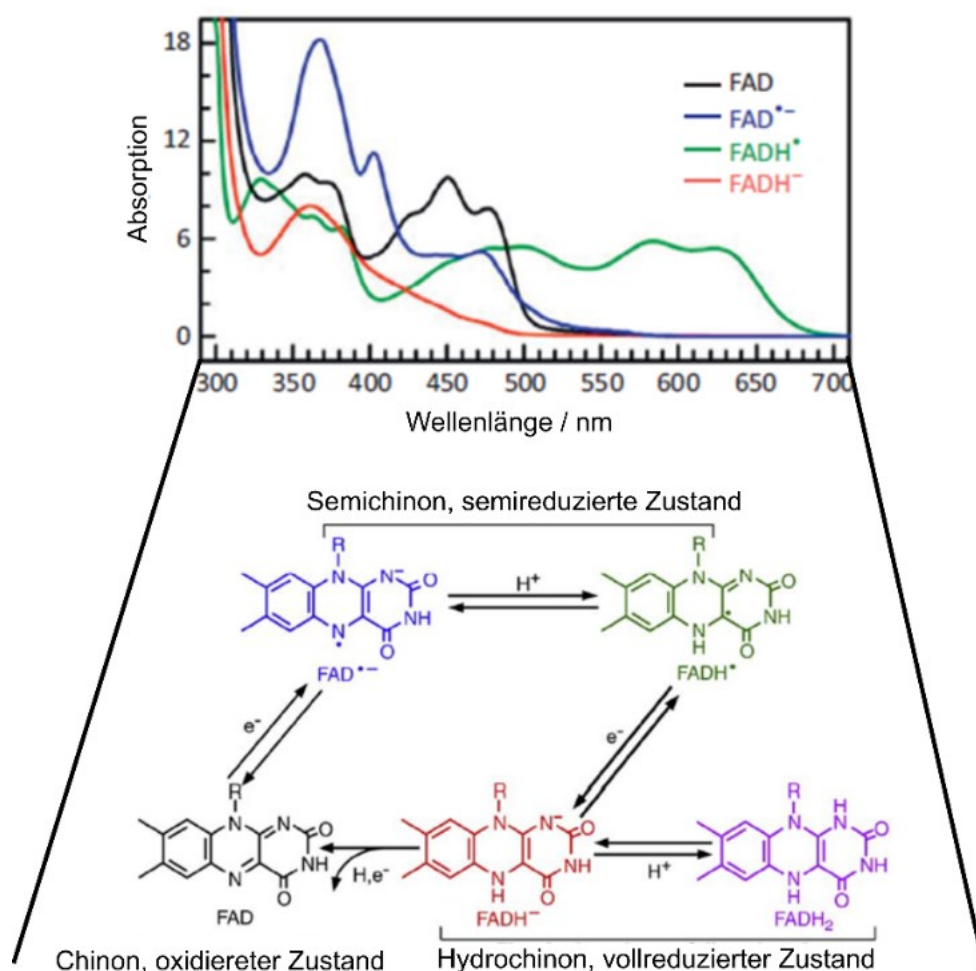
Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass AuPAC in der Lage ist, das cAMP-Level in Abhängigkeit von Blaulicht zu regulieren. Dies wurde durch Beobachtung der Lokalisation des Transkriptionsfaktors Msn2 gezeigt. Hierbei handelt es sich auch um eine validierte Methode zur Bestimmung von cAMP gesteuerter PKA Aktivität.<sup>124</sup> Auf das cAMP-Level wirkt durch AuPAC eine synergistische Regulation, da es durch zwei Komponenten beeinflusst wird. Erstens die blaublichtabhängige cAMP-Produktion von bPAC<sup>54</sup> und zweitens die Stabilisierung des Proteinlevels unter Blaulicht bzw. die Verringerung des Proteinlevels im Dunkeln. Mit diesen zwei Stellschrauben, bietet AuPAC die Möglichkeit der synergistischen Regulation des cAMP-Levels. Über die direkte Regulation der PKA bietet AuPAC neben der Lokalisation des Transkriptionsfaktors Msn2 und dem Wachstum, noch weitere Möglichkeiten zelluläre Funktionen in *S. cerevisiae* zu steuern (**Abbildung 41 B**).<sup>120</sup> Über den PKA-Signalweg werden, neben der Stressantwort durch Msn2 abhängiger Transkription weitere Zellfunktionen beeinflusst (**Abbildung 41 B**).<sup>120,134,135</sup> Ein wichtiges Ziel der PKA in der Stressantwort ist die Rim15-Proteinkinase.<sup>120,134</sup> Auch zytosolische Proteine werden über den PKA-Signalweg stimuliert, wie zum Beispiel die Pyruvatkinase 1 und 2 und die Phosphofructokinase.<sup>120</sup> So kann z.B. mit Hilfe von AuPAC Einfluss auf den Metabolismus und die Glykolyse genommen werden (**Abbildung 41 B**).<sup>120,134</sup> Durch die Phosphorylierung von Pop2 und die indirekte Kontrolle von Cln3 durch die PKA<sup>120</sup> lässt sich auch über AuPAC der Zellzyklus

beeinflussen (**Abbildung 41 B**). Die Involvierung der PKA in die ribosomale Biogenese ist bekannt aber noch nicht vollständig verstanden. Jedoch ist anzunehmen, dass PKA einen Einfluss auf den RNA-Polymerase III Repressor MafI und somit auf die Transkription hat (**Abbildung 41 B**).<sup>120</sup> AuPAC stellt abschließend eine neuartige photoaktivierbare Adenylatcyclase dar, die im Vergleich zu den bekannten PACs die Möglichkeit bietet durch synergistische Regulation des Protein- und des cAMP-Levels durch Blaublicht, direkten Einfluss auf eine Vielzahl von regulierbaren Zellfunktion über den PKA-Signalweg zu nehmen. Dies macht AuPAC zu einem starken regulatorischen Instrument um das cAMP-Level zu beeinflussen. Dieses Instrument könnte weiterhin dafür genutzt werden die Signalwege der PKA<sup>120</sup> (**Abbildung 41 B**) besser zu verstehen und daraus Anwendungen zu entwickeln, in denen unter Blaublicht gezielt einzelne Signalwege an- oder abgeschaltet werden.

Neben AuPAC mit AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> als Destabilisierungssequenz im Dunkeln wurde von *Mondal et al.* für Säugerzellen GLIMPSe (*generalizable lightmodulated protein stabilization system*) als unter Blaublicht stabilisierte optogenetische Anwendung entwickelt, die sogleich im Dunkeln destabilisiert.<sup>136</sup> Auch hier ist ein Zielprotein mit einer LOV-Domäne fusioniert. Über die  $\alpha$  Helix der LOV ist das Zielprotein C-terminal mit einer TEV-Schnittstelle und der Degronsequenz verbunden.<sup>136</sup> In Dunkelheit kommt es zu Proteindegradation, unter Blaublicht entfaltet sich die  $\alpha$  Helix und die TEV-Proteaseschnittstelle wird freigelegt.<sup>136</sup> Die TEV-Protease kann an der Schnittstelle angreifen und die Degronsequenz abspalten, dies führt zur Stabilisierung des Zielproteins unter Blaublicht.<sup>136</sup> Für die Funktionalität dieser optogenetische Anwendung ist zusätzlich ein TEV-Protease-LEXY-Konstrukt nötig, sodass die TEV-Protease blaublichtabhängig aus dem Kern ausgeschleust wird.<sup>136</sup> Dieses zusätzliche Konstrukt macht GLIMPSe zu einem Zweikomponentensystem im Vergleich zu AuPAC. Beide Anwendungen können als ergänzend angesehen werden, jedoch liegt der Vorteil von AuPAC darin, dass es auf einer Komponente, der destabilisierenden AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> Domäne, beruht. Mit AuPAC konnte gezeigt werden, dass basierend auf der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> Domäne das Proteinlevel posttranslational gesteuert werden kann und so die Konzentration von physiologisch relevanten Stoffen gesteuert werden kann. Allgemein bietet die AuLOV Domäne aufgrund ihres Heterogenen Dimerisierungsverhalten die Möglichkeit mit gezielten Mutationen in der Dimerisierungsfläche die Homogenisierung zu beeinflussen. Diese macht die AuLOV-cODC1<sup>CA</sup> Domäne zu einer optogenetischen Anwendung, die Potenzial für weitere Applikationen neben AuPAC besitzt.

### 6.5 CraCry als optogenetische Anwendung in *S. cerevisiae*

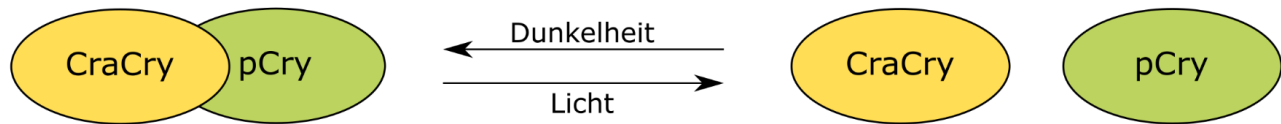
Das *animal-like* Cryptochrom (CraCry) aus *C. reinhardtii*, besitzt Aufgrund seiner verschiedenen Redox-Zustände die Eigenschaft rotes und blaues Licht zu absorbieren (**Abbildung 42**).<sup>65</sup> Diese verschiedenen Redox-Zustände bieten das Potenzial für eine optogenetische Anwendung, die sich sowohl mit blauem als auch mit roten Licht steuern lässt. Weiterhin ist strukturell die C-terminale Helix von CraCyr mit der  $\text{J}\alpha$ -Helix vergleichbar, da neusten Ergebnisse der ESSEN Gruppe eine Entfaltung im semichinoiden Zustand zeigen und im oxidierten Zustand eine gefaltete Helix. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden verschiedene Konstrukte von CraCry im psd-Modul getestet.



**Abbildung 42:** Absorptionsspektren und Darstellung der verschiedenen Redox-Zustände des FADs des *animal-like* Cryptochrom CraCry. (Nach *Lui et al.*<sup>65</sup>). CraCry absorbiert als blaues Licht im oxidierten Zustand, rotes Licht im semichinoiden Zustand. Diese verschiedenen Redox-Zustände bieten das Potenzial für eine optogenetische Anwendung, welche sich mit rotem und blauem Licht steuern lässt.

Die Varianten drei und neun der Konstrukte, zeigen ein Schaltverhalten zwischen Blaulicht und Rotlicht. Unter blauem Licht sind diese stabiler als unter rotem Licht; auch zwischen Dunkelheit und Blaulicht wurde ein Schaltverhalten beobachtet. Durch diesen Austausch des Photorezeptors, von LOV-Domäne zu CraCry, konnte zum ersten Mal ein rotlichtsensitives Degradationssystem entwickelt werden. Die Schaltrate ist im Vergleich zu den psd-Modulvarianten basierend auf der LOV2-Domäne um bis zu 90% (psd3) geringer<sup>6,28,29</sup> und etwa in der Größenordnung der AuLOV-Mutanten mit inaktivem Degron. Eine Kombination mit einem blaulichtinduzierbaren Expressionssystem in *S. cerevisiae*<sup>137</sup> würde sich anbieten um den Schaltfaktor zu verbessern. Bisher gibt es noch wenige optogenetische Anwendungen in *S. cerevisiae*, die auf rotes Licht reagieren. Basierend auf der PhyB/PIF-Interaktion wurde ein rotlichtinduzierbares Expressionssystem entwickelt, welches durch hell-rotes Licht wieder inaktiviert werden kann.<sup>137</sup> Basierend auf dem rotlichtsensitiven Bakteriophytochrom *DdBPhy* wurde von *Stiven et al.* durch die Fusion mit der Adenylatcyclase Cya2 eine rotlichtaktivierbare Adenylatcyclase *DdPAC* entworfen.<sup>138</sup> Es wäre denkbar, dass CraCry als Schalter zwischen Rotlicht und Blaulicht in optogenetischen Anwendungen fungieren kann. Basierend auf Cryptochrom zwei (Cry2) aus *Arabidopsis thaliana* sind optogenetische Anwendungen entwickelt worden. Von *Kennedy et al.* wurde das oben erwähnte blaulichtinduzierbare Expressionssystem auf Cry2 und CIBN Interaktion entwickelt<sup>139</sup>; später wurde dieses System in *S. cerevisiae* etabliert.<sup>137</sup> Die Interaktion von CIBN und Cry2 diene als Vorlage zur Entwicklung einer Zwei-Photonenaktivierung des Cryptochroms basierend auf dem Förster-Resonanzenergietransfer, genannt FRAPA (*FRET-assisted Photoaktivierung*).<sup>140</sup> Abschließend wurde die *extracellular-signal regulated* Kinase mittels FRAPA über zwei Photonen aktiviert.<sup>140</sup> Aus CraCry aus *C. reinhardtii* ist noch keine optogenetische Anwendung literaturbekannt. Der Vorteil gegen über den bisherigen rotlichtaktivierbaren Anwendungen ist, dass CraCry aufgrund der verschiedenen Redoxzustände nicht nur mit Rotlicht, sondern auch mit Blaulicht angeregt werden kann. Das psd-Modul könnte auch dazu verwendet werden um CraCry-Mutanten auf ihre Stabilität zu überprüfen. Die CraCry-Mutante Y373F zeigt zum Beispiel kein Photoschaltverhalten, da es nicht mehr zur Ausbildung des Tyrosinradikals kommt.<sup>76</sup> Ihr Verhalten im psd-Modul würde Informationen über die Stabilität des oxidierten Zustandes von CraCry *in vivo* liefern. Weitere Mutanten könnten in der Tryptophan-Triade oder in dem Bereich der C-terminalen Helix des CraCrys liegen. Im psd-Modul zeigte die CraCryV7-Variante ohne cODC1-Degron unter allen Lichtbedingungen eine gleichbleibende Stabilität, wohingegen die CraCryV9-Variante mit inaktivem cODC1-Degron ein

Schalterverhalten zeigt. Dies deutet auf eine Destabilisierung von CraCry durch die Verlängerung der C-terminalen Helix durch ein ungeordnetes Fragment hin. Die bisherigen CraCry-Varianten basieren alle auf CraCry $\Delta$ 496, dem die C-terminale Verlängerung (CTE) fehlt. Eine Variante basierend auf der CraCry7-Variante (ohne cODC1) mit CTE, könnte Informationen liefern ob der CTE eine stabilisierende oder destabilisierende Wirkung auf CraCry hat.



**Abbildung 43:** Heterodimerisierung von CraCry und pCry in *C. reinhardtii*. Das Heterodimer fungiert als negativer Regulator des Sexualzyklus.<sup>77</sup>

Weiterhin wurde beobachtet, dass die Länge des C-Terminus der verschiedenen Varianten einen Einfluss auf die Stabilität hat. Die von *Franz-Badur* auf HDX-Daten basierende Hypothese, dass die CTE in Dunkelheit zum Teil gefaltet vorliegt und an CraCry bindet<sup>73</sup>, würde bestärkt werden. Des Weiteren könnten wichtige Information über das *in vivo* Verhalten von CraCry gewonnen werden. Von *Zou et al.* wurde die Kontrolle des Sexualzyklus von *C. reinhardtii* durch CraCry beschrieben.<sup>77</sup> Im Dunkeln interagiert CraCry mit pCry (pflanzliches Cryptochrom) und bilde ein Heterodimer aus (**Abbildung 43**), diese fungieren als negativer Regulator des Sexualzyklus.<sup>77</sup> Zur Kontrolle des Sexualzyklus in *C. reinhardtii* berichten *Zou et al.*, davon das CraCry auch mit rotem Licht angeregt wird.<sup>77</sup> Durch eine optogenetische Anwendung basierend auf CraCry wäre das Potential gegeben um Einfluss auf den Sexualzyklus in *C. reinhardtii* zunehmen und diesen weiter zu erforschen.

## 7 Ausblick und Fazit

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von optogenetischen Modulen basierend auf verschiedenen Flavo-Proteinen. Erstens wurde in dieser Arbeit basierend auf der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup> Domäne mit inaktivem psd-Modul (AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup>), welche als Destabilisierungssequenz im Dunkeln dient, ein neues optogenetisches Modul entwickelt. Dafür wurden verschiedene AuLOV Mutanten auf ihre proteinchemischen Eigenschaften und ihre Struktur untersucht. Weiterhin wurden diese Mutanten im Kontext des psd-Moduls getestet. Die *in vivo* Charakterisierung der AuLOV-Mutanten im psd-Modul zeigte z. T. ein unerwartetes Verhalten. Dies lässt sich mit der gefundenen alternativen Konformation in der Dimeranordnung der AuLOV-Domäne von *P. tricornutum* erklären. Durch die Kristallisation der AuLOV<sup>V254M</sup>- und AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante konnte gezeigt werden, dass neben den bisherigen Dimerstrukturen der AuLOV-Domäne (PDB: 5dkl und 5a8b)<sup>36,48</sup> noch eine weitere Dimeranordnung existiert. Diese führt zu interessanten Fragen: Kommt diese alternative Dimeranordnung im intakten Aureochrom natürlich vor? Wie heterogen bzw. homogen ist die Dimerisierung? Hat diese eine physiologische Bedeutung?

In diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass alternative Konformationen einen großen Einfluss auf das *in vivo* Verhalten haben können. Möglich wäre, dass man in weiteren Arbeiten, ein biologisches *read out* entwickelt, um die strukturellen Änderungen der AuLOV-Domäne in *S. cerevisiae* weiter zu untersuchen. Zweitens, wurde ein weiteres optogenetisches Modul durch die Fusion von AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-cODC1<sup>CA</sup> mit bPAC entworfen; nämlich AuPAC. AuPAC wurde in *S. cerevisiae* zur Anwendung gebracht und bietet dort die Möglichkeit durch synergistische Regulation die Protein- und cAMP-Level mittels Blaulicht zu beeinflussen. So stellt AuPAC eine Anwendung dar, die direkten Einfluss auf eine Vielzahl verschiedener Zellfunktionen über den PKA-Signalweg in *S. cerevisiae* nehmen kann. Drittens hat diese Arbeit gezeigt, dass CraCry ein hohes Potenzial für eine optogenetische Anwendung besitzt. So zeigen CraCry $\Delta$ 496 Varianten im psd-Modulkontext ein verringertes Proteinlevel unter Rotlicht, Grünlicht und in Dunkelheit im Vergleich zum Proteinlevel unter Blaulicht in *S. cerevisiae*. Somit ist die Entwicklung eines rotlichtbasierten Proteindegradationsystems unter Nutzung von CraCry als Photorezeptor möglich, sofern weitere Optimierungen bzgl. Schaltrate gelingen.

Abschließend lässt sich sagen, dass diese Arbeit zur Erweiterung der optogenetischen *Tool-box* der Optogenetik beigetragen hat.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Miesenböck, G. The optogenetic catechism. *Science*. **311**, 17–19 (2009).
2. Knöpfel, T. *et al.* Toward the second generation of optogenetic tools. *J. Neurosci.* **30**, 14998–5004 (2010).
3. Lawrence, D. & O’banion, C. P. Optogenetics: A Primer for Chemists. *ChemBioChem* 1–48 (2018).
4. Müller, K. & Weber, W. Optogenetic tools for mammalian systems. *Mol. Biosyst.* **9**, 596–608 (2013).
5. Tabor, J. J., Levskaya, A. & Voigt, C. a. Multichromatic control of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **405**, 315–24 (2011).
6. Renicke, C., Schuster, D., Usherenko, S., Essen, L. O. & Taxis, C. A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. *Chem. Biol.* **20**, 619–626 (2013).
7. Pastrana, E. Optogenetics: controlling cell function with light. *Nat. Methods* **8**, 24–25 (2011).
8. Hasenjäger, S. *et al.* Lichtsignale für die Hefe. *Biospektrum* 628–630 (2019).
9. Kim, B. & Lin, M. Z. Optobiology: optical control of biological processes via protein engineering. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1183–8 (2013).
10. Kolar, K. & Weber, W. ScienceDirect Synthetic biological approaches to optogenetically control cell signaling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **47**, 112–119 (2017).
11. Losi, A., Gardner, K. H. & Möglich, A. Blue-Light Receptors for Optogenetics. *Chem. Rev.* **118**, 10659–10709 (2018).
12. Bandara, S. *et al.* Photoactivation mechanism of a carotenoidbased photoreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 6286–6291 (2017).
13. Ben-Nissan, G. & Sharon, M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules* **4**, 862–84 (2014).



14. Trauth, J., Scheffer, J., Hasenjäger, S. & Taxis, C. Synthetic Control of Protein Degradation during Cell Proliferation and Developmental Processes. *ACS Omega* **4**, 2766–2778 (2019).
15. Hershko, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479 (1998).
16. Varshavsky, A. The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 383–387 (1997).
17. Ravid, T. & Hochstrasser, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 679–689 (2008).
18. Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T. & Kaiser, P. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **192**, 319–60 (2012).
19. Eroles, J. & Coffino, P. Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 216–21 (2014).
20. Hoyt, M. a, Zhang, M. & Coffino, P. Ubiquitin-independent mechanisms of mouse ornithine decarboxylase degradation are conserved between mammalian and fungal cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 12135–43 (2003).
21. Jariel-Encontre, I., Bossis, G. & Piechaczyk, M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* **1786**, 153–77 (2008).
22. Taxis, C. A safety catch for ornithine decarboxylase degradation. *Microb. Cell* **2**, 174–177 (2015).
23. Dohmen, R., Wu, P. & Varshavsky, A. Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science (80-. ).* **263**, 1273–1276 (1994).
24. Natsume, T. & Kanemaki, M. T. Conditional Degrons for Controlling Protein Expression at the Protein Level. *Annu. Rev. Genet.* **51**, 83–102 (2017).
25. Bongers, K. M., Chen, L., Liu, C. W. & Wandless, T. J. Small-molecule displacement of a cryptic degron causes conditional protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 531–537 (2011).
26. Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T. & Kanemaki, M. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat. Methods* **6**, 917–22 (2009).

27. Jungbluth, M., Renicke, C. & Taxis, C. Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron. *BMC Syst. Biol.* **4**, 176 (2010).
28. Usherenko, S., Stibbe, H., Muscò, M., Essen, L. & Kostina, E. A. Photo-sensitive degron variants for tuning protein stability by light. *BMC Syst. Biol.* **8**, 1–15 (2014).
29. Hasenjäger, S. *et al.* Optogenetic Downregulation of Protein Levels with an Ultrasensitive Switch. *ACS Synth. Biol.* **8**, 1026–1036 (2019).
30. Glantz, S. T. *et al.* Functional and topological diversity of LOV domain photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E1442–E1451 (2016).
31. Herrou, J. & Crosson, S. Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 713–23 (2011).
32. Pudasaini, A., El-Arab, K. K. & Zoltowski, B. D. LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling. *Front. Mol. Biosci.* **2**, 18 (2015).
33. Banerjee, A. *et al.* Allosteric communication between DNA-binding and light-responsive domains of diatom class i aureochromes. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5957–5970 (2016).
34. Kalvaitis, M. E., Johnson, L. A., Mart, R. J., Rizkallah, P. & Allemann, R. K. A Noncanonical Chromophore Reveals Structural Rearrangements of the Light-Oxygen-Voltage Domain upon Photoactivation. *Biochemistry* **58**, 2608–2616 (2019).
35. Pudasaini, A. *et al.* Kinetics of the LOV domain of ZEITLUPE determine its circadian function in *Arabidopsis*. *Elife* **6**, 1–27 (2017).
36. Banerjee, A., Herman, E., Kottke, T. & Essen, L. Structure of a Native-like Aureochrome 1a LOV Domain Dimer from *Phaeodactylum tricornutum*. *Structure* **24**, 1–8 (2016).
37. Crosson, S. & Moffat, K. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2995–3000 (2001).
38. Losi, A. & Gärtner, W. Solving Blue Light Riddles: New Lessons from Flavin-binding LOV Photoreceptors. *Photochem. Photobiol.* **93**, 141–158 (2017).
39. Christie, J. M. *et al.* Structural tuning of the fluorescent protein iLOV for improved photostability. *J. Biol. Chem.* **287**, 22295–304 (2012).

40. Woolley, G. A. Designing chimeric LOV photoswitches. *Chem. Biol.* **19**, 441–2 (2012).
41. Bannister, S., Böhm, E., Zinn, T., Hellweg, T. & Kottke, T. Arguments for an additional long-lived intermediate in the photocycle of the full-length aureochrome 1c receptor: A time-resolved small-angle X-ray scattering study. *Struct. Dyn.* **6**, 1–10 (2019).
42. Liu, Q. *et al.* A Photoactivatable Botulinum Neurotoxin for Inducible Control of Neurotransmission. *Neuron* **101**, 863–875 (2019).
43. Guntas, G. *et al.* Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 112–117 (2015).
44. Herman, E., Sachse, M., Kroth, P. & Kottke, T. Blue-light-induced unfolding of the J $\alpha$  helix allows for the dimerization of aureochrome-LOV from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochemistry* **52**, 3094–3101 (2013).
45. Herman, E. & Kottke, T. Allosterically regulated unfolding of the A' $\alpha$  helix exposes the dimerization site of the blue-light-sensing aureochrome-LOV domain. *Biochemistry* **54**, 1484–92 (2015).
46. Schellenberger Costa, B. *et al.* Aureochrome 1a is involved in the photoacclimation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One* **8**, e74451 (2013).
47. Hisatomi, O., Nakatani, Y., Takeuchi, K., Takahashi, F. & Kataoka, H. Blue light-induced dimerization of monomeric aureochrome-1 enhances its affinity for the target sequence. *J. Biol. Chem.* **289**, 17379–91 (2014).
48. Heintz, U. & Schlichting, I. Blue light-induced LOV domain dimerization enhances the affinity of aureochrome 1a for its target DNA sequence. *Elife* **5**, 1–21 (2016).
49. Linder, J. U. Class III adenylyl cyclases: Molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1736–1751 (2006).
50. Bassler, J., Schultz, J. E. & Lupas, A. N. Adenylate cyclases: Receivers, transducers, and generators of signals. *Cell. Signal.* **46**, 135–144 (2018).
51. Iseki, M. *et al.* A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* **415**, 1047–1051 (2002).

52. Gomelsky, M. & Klug, G. BLUF: A novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 497–500 (2002).
53. Schröder-Lang, S. *et al.* Fast manipulation of cellular cAMP level by light in vivo. *Nat. Methods* **4**, 39–42 (2007).
54. Stierl, M. *et al.* Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. *J. Biol. Chem.* **286**, 1181–1188 (2011).
55. Ryu, M.-H., Moskvina, O. V., Siltberg-Liberles, J. & Gomelsky, M. Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications. *J. Biol. Chem.* **285**, 41501–8 (2010).
56. Stierl, M., Penzkofer, A., Kennis, J. T. M., Hegemann, P. & Mathes, T. Key residues for the light regulation of the blue light-activated adenylyl cyclase from *Beggiatoa* sp. *Biochemistry* **53**, 5121–5130 (2014).
57. Lindner, R. *et al.* Photoactivation Mechanism of a Bacterial Light-Regulated Adenylyl Cyclase. *J. Mol. Biol.* **429**, 1336–1351 (2017).
58. Blain-Hartung, M. *et al.* Cyanobacteriochrome-based photoswitchable adenylyl cyclases (cPACs) for broad spectrum light regulation of cAMP levels in cells. *J. Biol. Chem.* **293**, 8473–8483 (2018).
59. Jansen, V., Jikeli, J. F. & Wachten, D. How to control cyclic nucleotide signaling by light. *Curr. Opin. Biotechnol.* **48**, 15–20 (2017).
60. Ohki, M. *et al.* Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 6659–6664 (2016).
61. Kerruth, S., Langner, P., Raffelberg, S., Gärtner, W. & Heberle, J. Characterization of the Blue-Light-Activated Adenylyl Cyclase mPAC by Flash Photolysis and FTIR Spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* **93**, 857–864 (2017).
62. Ryu, M.-H. *et al.* Engineering adenylate cyclases regulated by near-infrared window light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 10167–10172 (2014).
63. Essen, L. O., Franz, S. & Banerjee, A. Structural and evolutionary aspects of algal blue light

- p>receptors of the cryptochrome and aureochrome type.
- J. Plant Physiol.*
- 217**
- , 27–37 (2017).
64. Scheerer, P. *et al.* The class III cyclobutane pyrimidine dimer photolyase structure reveals a new antenna chromophore binding site and alternative photoreduction pathways. *J. Biol. Chem.* **290**, 11504–11514 (2015).
  65. Liu, B., Liu, H., Zhong, D. & Lin, C. Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 578–586 (2010).
  66. Klar, T., Pokorny, R., Moldt, J., Batschauer, A. & Essen, L. O. Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: Structural and Functional Analysis of its Complex with a Folate Light Antenna. *J. Mol. Biol.* **366**, 954–964 (2007).
  67. Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A. & Deisenhofer, J. Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science*. **268**, 1866–1872 (1995).
  68. Kiontke, S., Gnau, P., Haselsberger, R., Batschauer, A. & Essen, L. O. Structural and evolutionary aspects of antenna chromophore usage by class II photolyases. *J. Biol. Chem.* **289**, 19659–19669 (2014).
  69. Klar, T. *et al.* Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from *Thermus Thermophilus*. *ChemBioChem* **7**, 1798–1806 (2006).
  70. Zhang, F., Scheerer, P., Oberpichler, I., Lamparter, T. & Krauß, N. Crystal structure of a prokaryotic (6-4) photolyase with an Fe-S cluster and a 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine antenna chromophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7217–7222 (2013).
  71. Essen, L. O. Photolyases and cryptochromes: Common mechanisms of DNA repair and light-driven signaling? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 51–59 (2006).
  72. Franz, S. *et al.* Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* **46**, 8010–8022 (2018).
  73. Franz-Badur, S. *et al.* Structural changes within the bifunctional cryptochrome/photolyase CraCRY upon blue light excitation. *Sci. Rep.* **9**, 1–8 (2019).
  74. Beel, B. *et al.* A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **24**, 2992–3008 (2012).

75. Oldemeyer, S. *et al.* Essential role of an unusually long-lived tyrosyl radical in the response to red light of the animal-like cryptochrome acry. *J. Biol. Chem.* **291**, 14062–14071 (2016).
76. Nohr, D. *et al.* Extended Electron-Transfer in Animal Cryptochromes Mediated by a Tetrad of Aromatic Amino Acids. *Biophys. J.* **111**, 301–311 (2016).
77. Zou, Y. *et al.* An animal-like cryptochrome1 controls the Chlamydomonas sexual cycle. *Plant Physiol.* **174**, 1334–1347 (2017).
78. Duina, A. A., Miller, M. E. & Keeney, J. B. Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* **197**, 33–48 (2014).
79. Mortimer, R. K. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* **10**, 403–409 (2000).
80. Hinnen, A., Hicks, J. B. & Fink, G. R. Transformation of yeast. 1978. *Biotechnology* **24**, 337–341 (1992).
81. Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. & Fields, S. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 9578–9582 (1991).
82. Borodina, I. & Nielsen, J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnol. J.* **9**, 609–620 (2014).
83. Hepp, S. Engineering of a darkness-induced degradation system based on the aureochrome 1a LOV domain. *Masterarbeit Uni Marburg* (2016).
84. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130 (1986).
85. Invitrogen. pET28 vector. 1–2 (1998).
86. Sikorski, R. S. & Hieter, P. A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces ceratisiae*. *Genetics* **122**, 19–27 (1989).
87. Hasenjäger, S. Entwicklung eines ultrasensitiven optogenetischen Schalters zur Kontrolle der Proteinmenge. *Masterarbeit Uni Marburg*. (2018).

88. Pereira, G. & Tanaka, T. Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p–Bub2p checkpoint protein complex. *EMBO* **20**, 6359–6370 (2001).
89. Heinemeyer, W., Gruhler, a, Möhrle, V., Mahé, Y. & Wolf, D. H. PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 5115–20 (1993).
90. Gerlinger, U. M., Gückel, R., Hoffmann, M., Wolf, D. H. & Hilt, W. Yeast cycloheximide-resistant *crl* mutants are proteasome mutants defective in protein degradation. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2487–99 (1997).
91. Ramos, P. C., Höckendorff, J., Johnson, E. S., Varshavsky, A. & Dohmen, R. J. Ump1p Is Required for Proper Maturation of the 20S Proteasome and Becomes Its Substrate upon Completion of the Assembly. *Cell* **92**, 489–499 (1998).
92. Palanimurugan, R., Scheel, H., Hofmann, K. & Jürgen Dohmen, R. Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme. *EMBO J.* **23**, 4857–4867 (2004).
93. Trauth, J. Regulation der Proteinkinase A Aktivität in *Saccharomyces cerevisiae* durch eine lichtregulierbare Adenylatzyklase aus *Beggiatoa*. *Bachelorarbeit Uni Marburg*. (2015).
94. Ausubel, F. M. *Current protocols in molecular biology*. (Greene Pub. Associates, 1987).
95. Sherman, F. Getting Started with Yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3–41 (2002).
96. Sikorski, R. S. & Boeke, J. D. In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: From cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol.* **194**, 302–318 (1991).
97. Lutz, A. P., Renicke, C. & Taxis, C. *Controlling Protein Activity and Degradation Using Blue Light*. (Humana Press, 2016).
98. Janke, C. *et al.* A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–62 (2004).
99. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

100. Bähre, H., Danker, K. Y., Stasch, J. P., Kaefer, V. & Seifert, R. Nucleotidyl cyclase activity of soluble guanylyl cyclase in intact cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 1195–1199 (2014).
101. Beste, K. Y., Burhenne, H., Kaefer, V., Stasch, J.-P. & Seifert, R. Nucleotidyl Cyclase Activity of Soluble Guanylyl Cyclase  $\alpha 1 \beta 1$ . *Biochemistry* **51**, 194–204 (2012).
102. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **254**, 248–254 (1976).
103. Koch, M. H. J., Vachette, P. & Svergun, D. I. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Quarterly Reviews of Biophysics.* **36**, 147–227 (2003).
104. Franke, D. *et al.* ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J. Appl. Crystallogr.* **50**, 1212–1225 (2017).
105. Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242 (2011).
106. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
107. Schrodinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. (2015).
108. Krissinel, E. & Henrick, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2256–2268 (2004).
109. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797 (2007).
110. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
111. Chapman, S. K. & Reid, G. A. *Flavoprotein Protocols*. (Humana Press, 1999).
112. Czeslik, C., Seemann, H. & Winter, R. *Basiswissen Physikalische Chemie*. (Vieweg+Teubner, 2007).



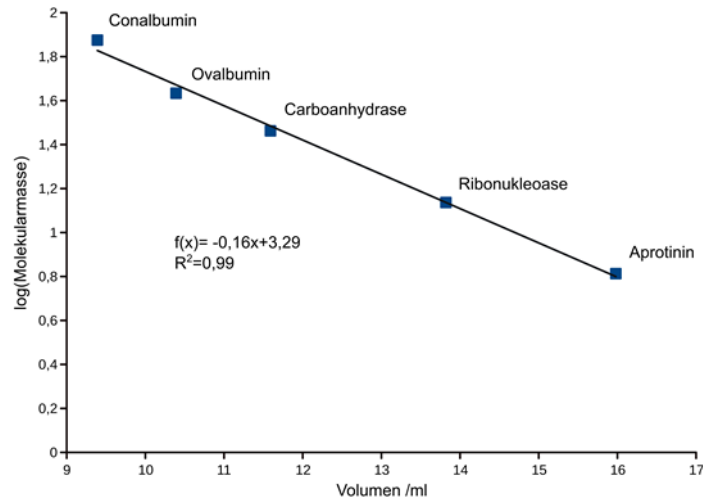
113. Sanjeev, R., Jagannadham, V. & Vraha, R. V. Implications of a novel interpretation of the isosbestic point. *Chem. New Zeal.* **76**, 133–135 (2012).
114. Nakasako, M., Zikihara, K., Matsuoka, D., Katsura, H. & Tokutomi, S. Structural Basis of the LOV1 Dimerization of Arabidopsis Phototropins 1 and 2. *J. Mol. Biol.* **381**, 718–733 (2008).
115. Heintz, A. *Thermodynamik*. (Springer Berlin Heidelberg, 2017).
116. Day, R. N. & Davidson, M. W. The fluorescent protein palette: Tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2887–2921 (2009).
117. Brennich, M., Pernot, P. & Round, A. *How to Analyze and Present SAS Data for Publication. Biological Small Angle Scattering: Techniques, Strategies and Tips* (Springer Singapore, 2017).
118. Rambo, R. P. & Tainer, J. A. Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering. *Nature* **496**, 477–81 (2013).
119. Shu, X., Shaner, N. C., Yarbrough, C. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* **45**, 9639–9647 (2006).
120. de Virgilio, C. The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 306–339 (2012).
121. Bolte, M., Dieckhoff, P., Krause, C., Braus, G. H. & Irniger, S. Synergistic inhibition of APC/C by glucose and activated Ras proteins can be mediated by each of the Tpk1-3 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **149**, 1205–1216 (2003).
122. Görner, W. *et al.* Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* **12**, 586–97 (1998).
123. Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L. & Vanoni, M. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sensors* **10**, 6195–6240 (2010).
124. Hao, N. & O'Shea, E. K. Signal-dependent dynamics of transcription factor translocation controls gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 31–39 (2012).
125. Bedke, D. K. *et al.* Relative Stereochemistry Determination and Synthesis of the Major Chlorosulfolipid from *Ochromonas danica*. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7570–7572 (2009).

126. Lokhandwala, J. *et al.* A native threonine coordinates ordered water to tune light-oxygen-voltage (LOV) domain photocycle kinetics and osmotic stress signaling in trichoderma reesei ENVOY. *J. Biol. Chem.* **291**, 14839–14850 (2016).
127. Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J. & Liang, J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.* **46**, W363–W367 (2018).
128. Oksanen, E., Chen, J. C. H. & Fisher, S. Z. Neutron crystallography for the study of hydrogen bonds in macromolecules. *Molecules* **22**, 1–26 (2017).
129. Lanzarotti, E., Biekofsky, R. R., Estrin, D. A., Marti, M. A. & Turjanski, A. G. Aromatic-aromatic interactions in proteins: Beyond the dimer. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 1623–1633 (2011).
130. Tazhigulov, R. N., Gayvert, J. R., Wei, M. & Bravaya, K. B. eMap: A Web Application for Identifying and Visualizing Electron or Hole Hopping Pathways in Proteins. *J. Phys. Chem. B* **123**, 6946–6951 (2019).
131. Mann, M., Serif, M., Jakob, T., Kroth, P. G. & Wilhelm, C. PtAUREO1a and PtAUREO1b knockout mutants of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* are blocked in photoacclimation to blue light. *J. Plant Physiol.* **217**, 44–48 (2017).
132. Huysman, M. J. J. *et al.* AUREOCHROME1a-mediated induction of the diatom-specific cyclin dsCYC2 controls the onset of cell division in diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*). *Plant Cell* **25**, 215–228 (2013).
133. Kroth, P. G., Wilhelm, C. & Kottke, T. An update on aureochromes: Phylogeny – mechanism – function. *Journal of Plant Physiology* 20–26 (2017) doi:10.1016/j.jplph.2017.06.010.
134. Conrad, M. *et al.* Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **38**, 254–299 (2014).
135. Jacquet, M., Renault, G., Lallet, S., De Mey, J. & Goldbeter, A. Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **161**, 497–505 (2003).
136. Mondal, P. *et al.* Repurposing Protein Degradation for Optogenetic Modulation of Protein

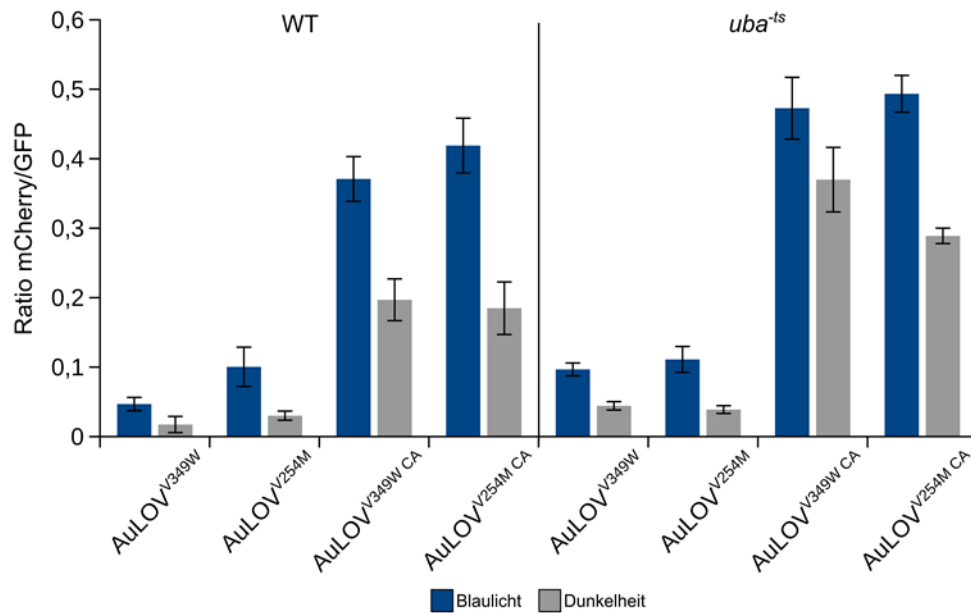
- Activities. *ACS Synth. Biol.* **8**, 2585–2592 (2019).
137. Hughes, R. M., Bolger, S., Tapadia, H. & Tucker, C. L. Light-mediated control of DNA transcription in yeast. *Methods* **58**, 385–391 (2012).
138. Stüven, B. *et al.* Characterization and engineering of photoactivated adenylyl cyclases. *Biol. Chem.* **400**, 429–441 (2019).
139. Kennedy, M. J. *et al.* Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **7**, 973–5 (2010).
140. Kinjo, T. *et al.* FRET-assisted photoactivation of flavoproteins for in vivo two-photon optogenetics. *Nat. Methods* **16**, (2019).

## 9 Anhang

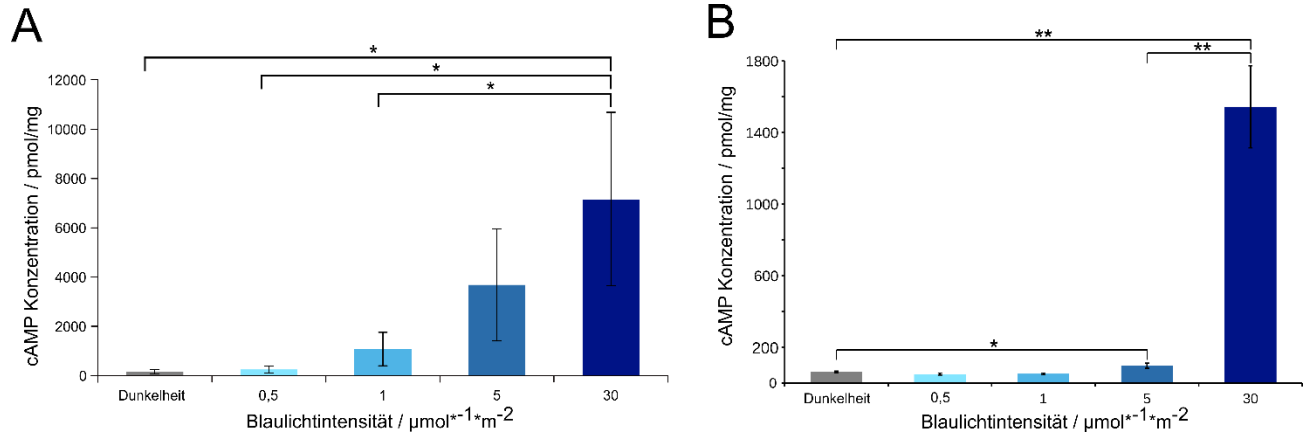
## 9.1 Abbildungen



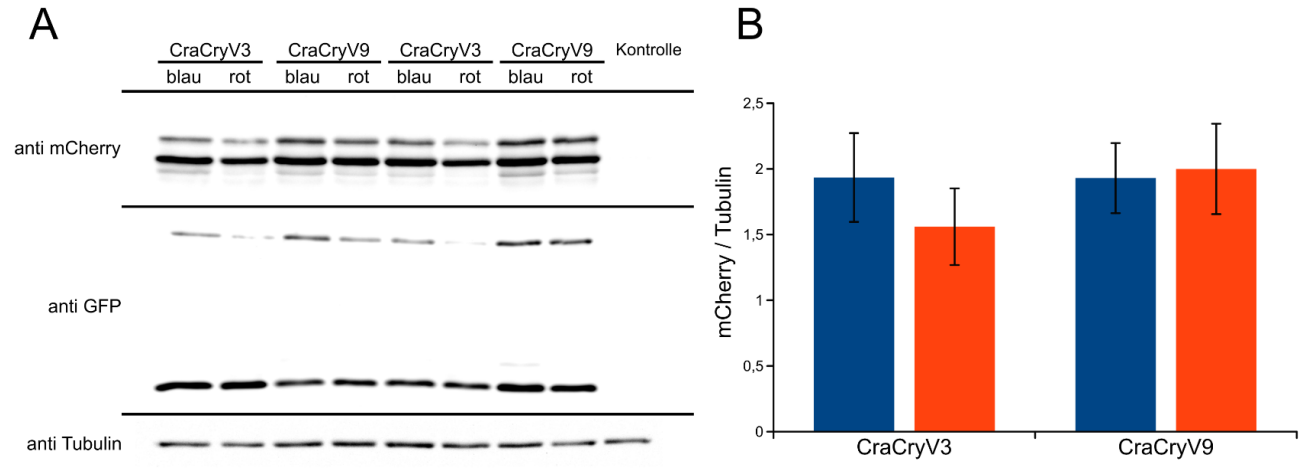
**Abbildung 44:** Kalibrationsgerade für die analytische SEC, Superdex75 Increase 10/300 GL.



**Abbildung 45:** Messungen der einzelnen Mutanten der AuLOV-Domäne im photosensitiven Degronmodul mit aktivem und inaktivem Degron (CA) in dem *uba<sup>-ts</sup>*-Stamm unter Blaulicht (465 nm, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) und in Dunkelheit. Die Mutanten zeigen im *uba<sup>-ts</sup>*-Stamm eine Zunahme des gesamten Proteinlevels sowie eine Annäherung des Proteinlevels in Dunkelheit und unter Blaulicht.

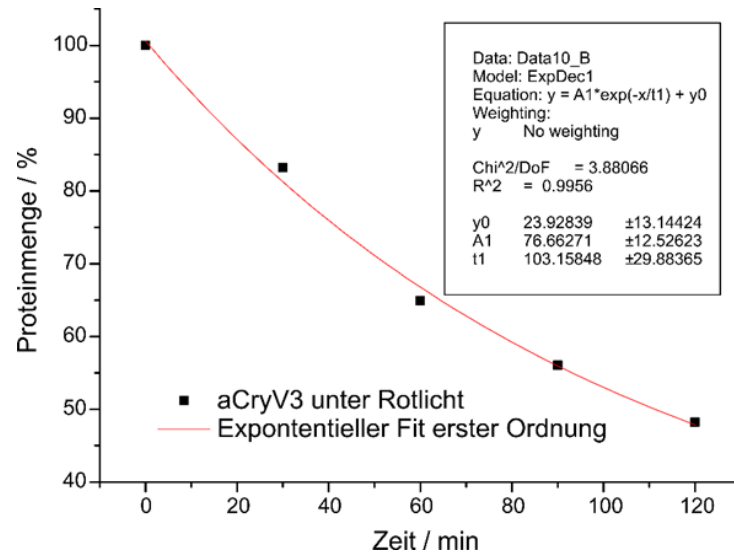


**Abbildung 46:** Bestimmung der cAMP-Menge in *S. cerevisiae*. **A:** Als Adenylatcyclase dient bPAC unter Kontrolle des *ADHI*-Promotors. Das cAMP-Level nimmt mit der Blaulichtintensität zu. Signifikant unterschiedlich sind die mit \* markierten Paare mit  $p \leq 0,05$ . **B:** Als Adenylatcyclase dient bPAC unter Kontrolle des *CYC1*-Promotors. Das cAMP-Level nimmt mit der Blaulichtintensität zu. Signifikant unterschiedlich sind die mit \* markierten Paare mit  $p \leq 0,05$  und die mit \*\* markierten Paare mit  $p \leq 0,01$ .

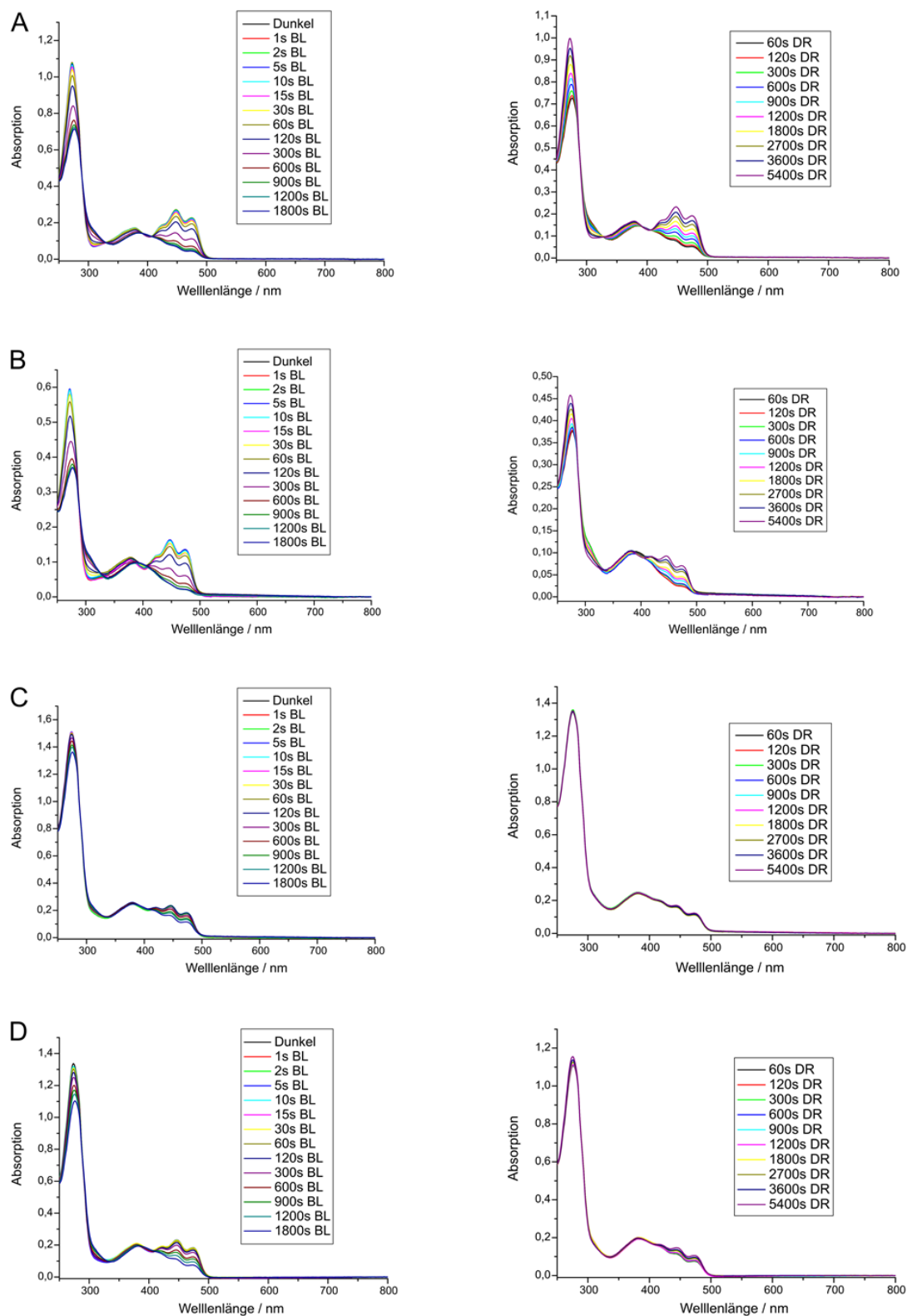


**Abbildung 47:** Westerblotanalyse der CraCry Varianten CraCryV3 und CraCryV9. **A:** Antikörper basierte Detektion der Varianten unter Blaulicht (465 nm,  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) und Rotlicht (630 nm,  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Die Molekularmassen der Signale wurden mit Hilfe des Markers auf der Membran abgeschätzt. Sie entsprechen den erwarteten Massen: Tubulin = 49,9 kDa, GFP = 28,9 kDa und die mCherry-3myc-CraCry-cODC1 Konstrukt = 89,9 kDa. Sowohl das mCherry-Signal als auch das GFP-Signal zeigt ein Kreuzsignal zu dem Konstrukt mit unvollständig gespaltenem P2A-Tag. **B:** Quantifizierung der Westerblots Varianten CraCryV3 und CraCryV9 unter Rot- und Blaulicht. Die Intensitäten der mCherry- und Tubulin-Signale wurden mit ImageJ ausgelesen und das mCherry-Signal wurde auf das Tubulin-Signal normiert. Beide Varianten zeigen ähnliche Proteinlevel unter Rotlicht wie auch unter Blaulicht. Die CraCryV3 Variante zeigt mit aktivem Degron ein ähnliches Proteinlevel wie die CraCryV9 Variante mit inaktivem Degron.

## 9 Anhang



**Abbildung 48:** Bestimmung der kinetischen Parameter der Abnahme der Proteinmengen von CraCryV3 unter Rotlicht gegen die Zeit aus Abbildung 34 A. Durch die Datenpunkte wurde ein exponentieller Zerfall erster Ordnung mit dem Programm Origin gelegt.



**Abbildung 49:** Exemplarische UV/VIS Spektren der AuLOV-Mutanten. Als erstes ist die Blaulichtbeleuchtung (BL) (455 nm,  $7,6 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) dargestellt und anschließend die Dunkelreversion (DR). **A:** AuLOV-Wildtyp, **B:** AuLOV<sup>V254M</sup>-Mutante, **C:** AuLOV<sup>V349W</sup>-Mutante, **D:** AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante.

## 9.2 Tabellen

**Tabelle 29:** Elutionsvolumen der Verdünnungsreihe der AuLOV<sup>V254M/V349W</sup>-Mutante im Licht- und Dunkelzustand. Die Peakfläche (PF) wurde als Mittelwert aus drei Messungen angegeben. Die Molekularmasse wurde mit der Kalibrationsgerade aus Abbildung 16 bestimmt.

	Konz. / mg/ml	Elutionsvolumen / ml	Molekularmasse / kDa	Peakfläche / %
Lichtzustand	0,125	10,3	48,6	100,0 +/- 0,0
	0,063	9,9	56,1	79,7 +/- 2,4
		11,7	29,4	20,3 +/- 2,4
	0,031	9,9	56,1	73,7 +/- 3,0
		11,8	28,3	26,3 +/- 3,0
	0,016	9,9	56,1	67,2 +/- 3,2
		11,9	27,3	32,8 +/- 3,2
Dunkelzustand	0,125	10,0	54,1	56,7 +/- 7,0
		11,6	30,4	43,3 +/- 7,0
	0,063	9,9	56,1	48,6 +/- 5,1
		11,8	28,3	51,4 +/- 5,1
	0,031	9,9	56,1	38,0 +/- 1,4
		12,0	26,3	62,0 +/- 1,4
	0,016	9,9	56,1	30,1 +/- 5,0
		12,0	26,3	69,9 +/- 5,0



### 9.3 Abkürzungen für Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Symbol
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## 9.4 Abkürzungen

Å	Ångström
A	Ampere
AID	Auxininduziertes Degron
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Blaulicht
bp	Basenpaar
bZIP	Leucin-Zipper-Domäne
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CIB1	<i>Cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein 1</i>
C-terminal	carboxylterminal
cODC1	<i>Murine ornithine decarboxylase-like</i> Degronsequenz
Cry2	Cryptochrome 2
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
CV	Säulenvolumen
d	Durchmesser
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	zweifach Destilliertes Wasser

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
$\epsilon$	Molarerextinktionskoeffizient
EB	Elutionspuffer
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FeCl <sub>2</sub>	Eisenchlorid
FMN	Flavinmononukleotid
FP	Fluoreszierendes Protein
Fwd	Vorwärts
$\Delta G$	freie Gibbs-Energie
G	Guanin
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	Borsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IgG	Immunoglobulin G
ipaA	<i>vinculin binding sequence</i>

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Kaliumiodid
konz.	Konzentration
l	Liter
lf	<i>low fluorescence</i>
LID	<i>ligand induced degraon</i>
LOV	light-oxygen-voltage
LED	<i>light emitting diode</i>
LFM	<i>low fluorescent media</i>
m	Meter
M	molar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MnSO <sub>4</sub>	Mangansulfat
min	Minute
MM	Molekularmasse
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Natriummolybdat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte

OFR	<i>open reading frame</i>
P2A	virale Sequenz zur Proteinseparation aus dem Porcin Teschovirus-1
PAS	PER-ARNT-SIM
PCR	Polymerasekettenreaktion
PISA	<i>Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies</i>
PEG	Polyethylenglykol
PDB	Protein-Datenbank
psd	Photosensitives Degron
rev	Rückwärts
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
R <sub>g</sub>	Streumassenradius
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAXS	Kleinwinkelröntgenstreuung
SC	Synthetischer Ergänzungsmix
SCF	Skp, Cullin, F-box Komplex
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Poly-Acrylamid-Gel
SEC	Größenausschlusschromatographie
SORB	Sorbitol
T	Thymin
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit

## 9 Anhang

TBE	Tris-Borsäure, EDTA
TBST	Tris-Borsäure, EDTA, SDS, Tween
TCA	Trichloressigsäure
ts	Temperatursensitives Degron
TEMED	Tetramethylthylendiamin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
Vis	<i>visible</i> , sichtbar
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht zu Volumen
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast peptone dextrose</i>
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat